

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Parazitologie

Katedra parazitologie



Bc. Kateřina Kvapilová

Vývoj leishmanií v hmyzím přenašeči rodu *Phlebotomus*

The development of *Leishmania* in the insect vector of the genus

Phlebotomus

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: Prof. RNDr. Petr Volf, CSc.

Praha 2012

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla veškerou použitou literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 20. 8. 2012

Kateřina Kvapilová

Ráda bych na tomto místě poděkovala svému školiteli panu profesorovi Petru Volfovi za odborné vedení, cenné rady a hlavně pozitivní přístup. Můj velký dík patří Jovaně Sádlové za pomoc při experimentech a za to, že tu pro mě vždy byla, když jsem potřebovala poradit a podpořit. Dále děkuji Janu Votýpkovi za provedení qPCR a pomoc se statistikou, a celému laboratornímu týmu za veselou atmosféru a ochotu vždy zkušeně poradit. Poděkovat chci také panu Zdeňku Cimburkovi za odbornou práci s FACS. V neposlední řadě děkuji své rodině a příteli Honzovi za podporu a pevné nervy během celého studia.

ABSTRAKT

Práce byla zaměřena na studium různých aspektů vývoje leishmanií v přenašečích rodu *Phlebotomus* a lze ji rozdělit na dvě hlavní části.

V první části jsme pomocí experimentálních koinfekcí fluorescenčně značenými promastigoty *Leishmania major* a *L. turanica* studovali kompetici těchto dvou druhů při vývoji ve flebotomech, kteří jsou přirozenými přenašeči *L. major*. Zatímco ve střevě *Phlebotomus papatasi* se obě leishmanie vyvíjely obdobným způsobem, u *P. duboscqi* převládla v pozdních stádiích infekce *L. turanica*. Fluorescenční značení nám zároveň mělo umožnit studovat případnou genetickou výměnu mezi druhy leishmanií v různých stádiích infekce (2., 9. a 14. den po infekčním sání). Metodou FACS byly v homogenátech střev koinfikovaných flebotomů opakovaně identifikovány desítky objektů emitujících červený i zelený signál, avšak následná kontrola konfokálním mikroskopem vyloučila možnost, že jsou to hybridní promastigoti leishmanií.

Ve druhé části práce jsme u *L. major* zkoumali roli genů HASP a SHERP, které leží na lokusu LmcDNA16 a jsou exprimovány výhradně u metacyklů. Používali jsme mutantní linie KO (postrádající celý lokus LmcDNA16) a HASPB (KO linie se zpět vloženým genem HASPB) a jejich vývoj v přenašeči a metacyklogenezi jsme porovnávali s kontrolní linií FVI. Důležitým cílem bylo též zjistit, zda se mutantní linie mohou přenášet na myši sáním nakažených flebotomů. U nakažených *P. papatasi* se kontrolní linie FVI přenesla pouze v 7%, zatímco HASPB linie ve 4% a KO linie ve 3%. Výraznější rozdíly byly zaznamenány u *P. duboscqi*, kde byla kontrolní linie přenesena ve 20%, zatímco linie KO v 7% a linie HASPB nebyla přenesena ani v jednom případě. Měření morfologických forem na střevních nátěrech a qPCR prokázaly, že obě mutantní linie tvoří metacyklická stadia v menší míře a v pozdních stádiích infekce se pomnoží méně než linie FVI. Domníváme se, že oba tyto rozdíly mohou způsobit sníženou schopnost přenosu mutantních linií sáním nakažených flebotomů.

Klíčová slova: *Phlebotomus*, *Leishmania*, HASP, SHERP, metacyklogeneze, genetická výměna

ABSTRACT

The work was focused on the study of various aspects of development of *Leishmania* in vectors of genus *Phlebotomus* and can be divided into two main parts.

In the first part, we studied the competition of *Leishmania major* and *L. turanica* during their development in the sand flies who are natural vectors of *L. major* using the experimental co-infections of fluorescently marked promastigots of these two species. While both leishmania species developed similar in the intestine of *Phlebotomus papatasi*, *L. turanica* prevailed in *P. duboscqi* in the late stages of infection. The fluorescent marking of *Leishmania* should allow us also to study possible genetic exchange between species at different stages of *Leishmania* infection (2nd, 9th and 14th day after the infective feeding). Using the flow cytometry (FACS) we have repeatedly identified dozens of objects emitting red and green signals in the intestinal homogenates of co-infected sand flies, however further analysis with confocal microscope disproved these objects as the hybrid promastigots of *Leishmania*.

In the second part of this thesis we investigated the role of *L. major* genes HASP and SHERP, which lies on the locus LmcDNA16 and are expressed exclusively in metacyclics. We used mutant lines KO (lacking the locus LmcDNA16) and HASPB (KO line with gene HASPB back inserted) and we compared their development in the vectors and the metacyclogenesis to the FVI control lines. It was also important to determine whether the mutant lines are capable be transmitted to mice by infected sand flies. *Phlebotomus papatasi* infected with FVI control line transmitted the parasites into the mouse in 7% of the cases, while HASPB line was transmitted in 4% and KO line in 3%. Considerable differences were observed using the vector *P. duboscqi* where FVI control line was transferred in 20%, while the KO line in 7% and HASPB line transfer was completely negative. Measurement of morphological forms in the intestinal smears and qPCR showed that both mutant lines form metacyclic stages a smaller degree and are propagated less than FVI line in late-stages of infection. We believe that both of these differences can cause a reduced ability of transmission of the mutant lines by the infected sand flies .

Key words: *Phlebotomus*, *Leishmania*, HASP, SHERP, metacyclogenesis, genetic exchange

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED	10
2.1	Sexuální rozmnožování rodu <i>Leishmania</i>	10
2.2	Mezidruhové a vnitrodruhové hybridy leishmanií	12
2.3	<i>Leishmania turanica</i> a její společná ohniska s <i>Leishmania major</i>	15
2.4	Vývoj <i>Leishmania major</i> v přenašeči.....	18
2.5	Role genů HASP / SHERP v metacyklogenezi leishmanií	21
3	MATERIÁL A METODIKA	24
3.1	Experimentální koinfekce <i>L. major</i> a <i>L. turanica</i> pro detekci hybridů	24
3.1.1	Použité druhy leishmanií a jejich kultivace	24
3.1.2	Chov flebotomů	24
3.1.3	Experimentální infekce	24
3.1.4	Pitva střev samic flebotomů, světelná a fluorescenční mikroskopie	25
3.1.5	Analýza metodou FACS a konfokální mikroskopie	25
3.2	Experimentální přenosy mutantních linií <i>L. major</i> na myš sáním <i>P. papatasi</i> a <i>P. duboscqi</i>	27
3.2.1	Použité druhy leishmanií a jejich kultivace	27
3.2.2	Myši	28
3.2.3	Experimentální infekce flebotomů	28
3.2.4	Infekční přenosy na myš	28
3.2.5	Izolace DNA a kvantitativní PCR (qPCR).....	29
3.2.6	Morfologická analýza buněk leishmanií	30
4	VÝSLEDKY	31
4.1	Experimentální koinfekce a detekce hybridů metodou FACS.....	31
4.2	Experimentální přenosy mutantních linií <i>L. major</i> na myš sáním <i>P. papatasi</i>	34
4.3	Experimentální přenosy mutantních linií <i>L. major</i> na myš sáním <i>P. duboscqi</i>	36
4.3.1	Infekční dávka 1×10^6 buněk / ml krve	36
4.3.2	Infekční dávka 1×10^7 buněk / ml krve	39
4.4	Morfologie mutantních linií <i>L. major</i> v přenašeči <i>P. duboscqi</i>	41
4.5	Srovnání intenzity infekce jednotlivými liniemi <i>L. major</i> mezi přenašeči <i>P. papatasi</i> a <i>P. duboscqi</i>	44
4.6	Srovnání doby sání mezi přenašeči <i>P. papatasi</i> a <i>P. duboscqi</i>	45

4.7	Průběh infekcí u myši nakažených mutantními liniemi <i>L. major</i>	47
5	DISKUZE	49
6	ZÁVĚREČNÉ SHRUTÍ	56
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	57

1 ÚVOD

Leishmaniózy jsou klinicky heterogenní skupinou onemocnění způsobených parazitickými prvky rodu *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Dodnes bylo popsáno přes 30 druhů leishmanií a světová zdravotnická organizace (WHO) odhaduje na 1,6 milionů nových případů leishmaniózy ročně. Obvykle jsou rozlišovány čtyři typy leishmaniózy: kožní (ulcerující noduly), kožně-slizniční, difúzní kožní a viscerální leishmanióza zasahující vnitřní orgány. Klinický projev onemocnění ovlivňují interakce mezi virulencí parazita a imunitní odpovědí hostitele. K nejvíce případům kožních leishmanióz dochází v Afganistánu, Alžírsku, Brazílii, Iránu, Peru, Saudské Arábii a Sýrii. Mezi nejčastější původce kožních leishmanióz patří ve Starém světě *Leishmania (L.) major*, *L. (L.) aethiopica*, *L. (L.) tropica*.

Leishmanie jsou přenášeny krevsajícími flebotomy (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) rodu *Phlebotomus* ve Starém světě a rodu *Lutzomyia* v Novém světě. Dodnes bylo popsáno přes 900 druhů flebotomů, avšak pouze asi 70 z nich je považováno za potvrzené či předpokládané přenašeče leishmaniózy (Killick-Kendrick 1990). Tento drobný hmyz se vyskytuje především v tropech a subtropích a jeho larvy, na rozdíl od komárů a muchniček, nejsou závislé na vodním prostředí. Obě pohlaví se živí cukernou potravou a samice navíc sají krev k získání energie pro tvorbu vajíček.

Vývoj leishmanií zahrnuje dvě rozdílné fáze. V obratlovcích se leishmanie vyskytují ve formě amastigotních stádií, která jsou schopná přežít v makrofázích hostitele. V bezobratlém přenašeči se vyvíjí v trávicí soustavě nejdříve jako neinfekční procykliční promastigoti, kteří se v konečné fázi vývoje v přenašeči mění na infekční metacyklická stadia. Tento diferenciační proces doprovází několik biochemických změn a tvorba specifických molekul, jako je povrchový glykokonjugát lipofosfoglykan nebo leishmaniolysin GP63 (Davies a kol. 1990). Mimo tyto dobře známé molekuly byly nedávno jako nezbytný faktor metacyklogeneze potvrzené také proteiny HASP a SHERP, jejichž geny leží na lokusu LmcDNA16 chromozomu 23 u *Leishmania major* (Sadlova a kol. 2010). V této diplomové práci jsem se snažila zjistit, zdali se leishmanie bez takových genů mohou přenášet sáním flebotoma do hostitele a způsobit následně kožní lézi.

Rozmnožování leishmanií bylo původně považováno za striktně klonální, jak je tomu u většiny prvoků. V přírodě však bylo pozorováno několik hybridů mezidruhových i vnitrodruhových (Ravel a kol. 2006, Rougeron a kol. 2009), recentně byli hybridy prokázáni i experimentálně (Akopyants a kol. 2009). Mechanismus sexuálního rozmnožování není znám,

ale udržení si takové to schopnosti, je v rámci klonální struktury populace velkou výhodou. Ve své diplomové práci jsem se proto pokusila, detekovat případné hybridy *L. major* a *L. turanica*. Oba tyto druhy leishmanií se vyskytují společně v endemických oblastech zoonotické kožní leishmaniózy Centrální Asie a mají společného přenašeče *Phlebotomus papatasi*.

Cílem mé diplomové práce bylo:

- Sledovat kompetici *L. major* a *L. turanica* při společném vývoji v *P. papatasi* a *P. duboscqi*.
- Zjistit, zdali jsou *L. major* a *L. turanica* schopné vzájemné hybridizace během vývoje v těchto druzích flebotomů.
- Porovnat intenzitu infekce u *P. papatasi* a *P. duboscqi* nakažených mutantními liniemi *L. major* HASPB a KO s kontrolní linií FVI.
- Zjistit, zdali jsou mutantní linie *L. major* schopné přenosu na myši sáním těchto flebotomů, a porovnat úspěšnost přenosu s kontrolní linií FVI.
- Porovnat procentuální zastoupení jednotlivých morfologických stádií u linií *L. major* FVI, HASPB a KO a zjistit, zdali zastoupení metacyklických stádií koreluje s četností přenosu.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Sexuální rozmnožování rodu *Leishmania*

Vznik a přetrvávání sexuálního rozmnožování je jednou z často zkoumaných otázek, jelikož evoluce je mimo jiné řízena také sexuální rekombinací. V mnohých teoriích o výhodách sexu je zahrnuta více než sto let stará myšlenka navržená Weismannem: sex zefektivňuje přirozenou selekci, jelikož zvyšuje genetickou variabilitu. V nově vytvořeném prostředí, kde je malý tlak selekce, má ale sex jen nepatrný efekt na fitness organismů (Goddard a kol. 2005). Sex může mít například malý důsledek v ideálním prostředí, kde je růst klonálních parazitů exponenciální. A to z toho důvodu, že může přerušit výhodnou kombinaci genů, která se osvědčila u rodičů. Další nevýhodou je dědičnost jen půlky rodičovských genů (Heitman 2006, Victoir a Dujardin 2002).

Sex hraje hlavní roli v inovaci a adaptivní evoluci a nese dvě výhody. Umožňuje míšení genů, bez něhož je adaptivní evoluce omezena na kumulaci příznivých mutací, a také umožňuje opravu DNA diploidního organismu, kdy DNA jednoho haplotypu může sloužit jako templát pro opravu DNA druhého haplotypu (Ayala 1998). Jakmile tedy začnou být pro parazita podmínky stresující, může vést genetická výměna k přežití a k rozpínavosti (Heitman 2006).

Sexuální rekombinace umožňuje adaptaci na nové ekologické niky, vektory a hostitele, jak potvrdily empirické nebo experimentální důkazy níže popsaných hybridů. Genetická rekombinace u rodu *Leishmania* může být významná z taxonomického a lékařského hlediska. Horizontální tok genů, například pro rezistenci k určitým lékům, může měnit epidemiologii těchto patogenů a to si vyžaduje změny i ve strategii léčby. Toto potvrzují například hybridy *L. major* / *L. infantum*, kteří se mohou, díky širokému rozšíření *P. papatasi*, adaptovat na nová ohniska (Belli a kol. 1994, Volf a kol. 2007).

Zpočátku převažoval názor, že se leishmanie rozmnožují jako většina prvoků binárním dělením buňky a diverzita tohoto rodu byla připisována postupné akumulaci různých mutací. Dlouhou dobu se také myslelo, že leishmanie nejsou schopné genetické výměny, ale že jeden rodič dá dělením vzniknout dvěma identickým potomkům.

Tibayrenc a kol. (1990) navrhnul, na základě populačně genetických analýz, pro výše zmíněný způsob rozmnožování obecnou klonální teorii parazitických prvoků. Podle klonální teorie jednoznačně převažuje v přírodních podmínkách asexuální rozmnožování a generuje klony, které jsou stabilní v čase i prostoru. V rámci této teorie navrhli autoři i několik kritérií klonality: absence rekombinantních genotypů, fixovaná heterozygotnost, rozšířené identické

genotypy, vazebná nerovnováha (nenáhodná asociace genotypů působících na odlišných lokusech) a vzájemný vztah dvou nezávislých sad genetických markerů (Tibayrenc a kol. 1990, 1991).

Kvůli přibývajícimu pozorování hybridních jedinců v přírodních populacích (Kelly a kol. 1991, Belli a kol. 1994, Dujardin a kol. 1995, Delgado a kol. 1997) se později možnost existence genetické výměny u leishmanií nevyklučovala, ale byla považovaná za velmi vzácnou a neschopnou výrazně pozměnit přetrvávající klonální populaci (Tibayrenc a Ayala 2002, Victoir a Dujardin 2002). Pozdější důkazy o přirozeně se vyskytujících hybridech, jak interspecifických (Ravel a kol. 2006, Nolder a kol. 2007) tak intraspecifických (Chargui a kol. 2009, Rougeron a kol. 2009), ještě více posilovaly myšlenku, že leishmanie jsou schopné sexuální rekombinace, podobně jako trypanosomy (Jenni a kol. 1986).

První experimentální důkaz genetické výměny u leishmanií poskytl Akopyants a kol. (2009). Při vývoji geneticky pozměněných rodičovských klonů *L. major* v přirozeném přenašeči *Phlebotomus duboscqi* zjistili, že jsou leishmanie v přenašeči schopné sexu a produkce hybridních potomků, kteří jsou dále schopni přenosu na savčího hostitele. Rodičovské kmeny byly rezistentní na rozdílná antibiotika. Získaných 12 hybridů zdědilo od každého rodiče nejméně jednu sadu chromozomů, včetně alel pro rezistenci, a byli tak rezistentní k oběma antibiotikům současně. Oproti tomu kinetoplastidová DNA (kDNA) maxikroužků byla zděděna pouze od jednoho z rodičů. Sexuální cyklus pravděpodobně zahrnoval Mendelovský model meiózy (vytvoření haploidních gamet, které posléze splynou), shodný s modelem popsáním u Afrických trypanosom (Jenni a kol. 1986, MacLeod a kol. 2005). Avšak 7 z 18 hybridních klonů bylo triploidních (obsahovali tři sady chromozomů), což mohlo nastat neúplným meiotickým dělením a splynutím haploidního jádra s diploidním jádrem (Akopyants a kol. 2009).

Další studie, která zpochybňuje (tentokrát na základě empirických dat) striktně klonální model reprodukce leishmanií, byla provedena na populaci *L. braziliensis* (Rougeron a kol. 2009). *Leishmania braziliensis* způsobuje vážné zdravotní problémy v Jižní Americe, a to kožní a kožně-slivniční leishmaniózu. K analýze 124 lidských isolátů *L. braziliensis* z Peru a Bolívie bylo použito 12 mikrosatelitních genotypů, popsanych pro *L. braziliensis*. Výsledkem byl překvapivě silný nedostatek heterozygotnosti u isolátů *L. braziliensis*. Velká část z nich byla výsledkem tzv. Wahlundova efektu, který produkuje ztrátu heterozygotnosti. Wahlundův efekt nastane tehdy, jestliže se vzorek skládá z jedinců, kteří byli odebráni z geneticky rozdílných subpopulací (Rougeron a kol. 2009). Přesto se nedostatek heterozygotnosti neslučuje s klonálním modelem, ale spíše podporuje existenci křížení mezi příbuznými jedinci

L. braziliensis (endogamie). Autoři navrhuji, že by leishmanie mohly zaměňovat dva modely rozmnožování, a to klonalitu v obratlovčím hostiteli a v bezobratlém přenašeči, a občasnou rekombinaci v přenašeči (mezi příbuznými i nepříbuznými jedinci) (Rougeron a kol. 2009, 2010).

Dalšími důkazy hybridizace v Novém i Starém světě (Obr. 1) se zabývám v následujících kapitolách.

2.2 Mezidruhová a vnitrodruhová hybridní leishmanií

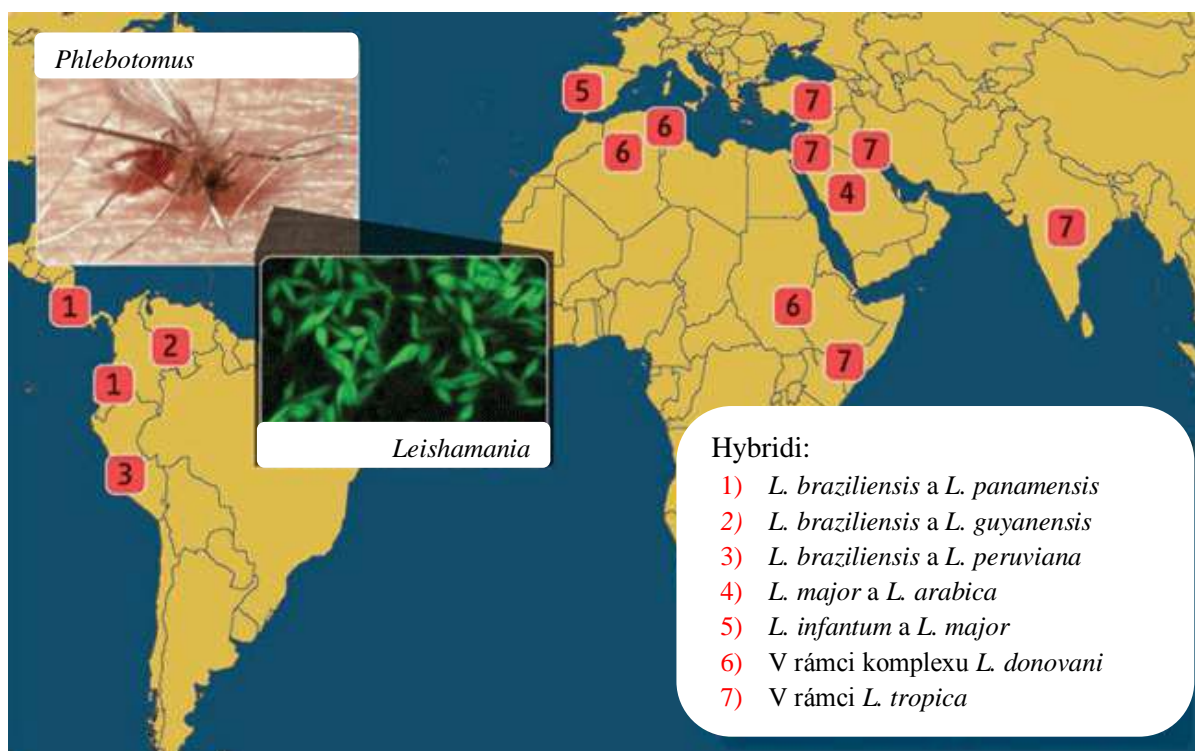
V Novém světě se kromě podrodu *Leishmania* vyskytuje i podrod *Viannia*, způsobující kožní (CL) a kožně-slizniční leishmaniózu (MCL). Podrod *Viannia* zahrnuje mimo jiné *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) panamensis* a *L. (V.) guyanensis*.

Belli a kol. (1994) popsali 40 izolátů leishmanií, získaných od pacientů nakažených buď kožní nebo kožně – slizniční leishmaniózou v Nikaragui. Z těchto 40 vzorků vykazovalo 11 (27%) izolátů genetické znaky *L. braziliensis* i *L. panamensis*. Všichni tito přirozeně se vyskytující hybridní *L. braziliensis* / *L. panamensis* byli získáni ze severního regionu Nikaragui, kde se tyto dva druhy vyskytují současně. Rovněž byli izolováni i v Ekvádoru, což potvrzuje, že genetická výměna nemusí být u těchto organismů tak neobvyklá.

Kožní a kožně slizniční leishmanióza je endemická i pro jihoamerický stát Peru. S kožní leishmaniózou je zde nejvíce spojována *L. braziliensis* a *L. peruviana*, původcem MCL je pak *L. braziliensis*. Tyto dva druhy se liší v geografickém rozšíření. *Leishmania braziliensis* se převážně vyskytuje v nižších výškách Amazonského pralesa, zatímco *L. peruviana* se nachází ve výšinách západních And. Společně se mohou vyskytovat v oblasti Huanuko, kde se stýká Amazonský prales s Andským pohořím. A právě z toho místa byli popsáni hybridní *L. braziliensis* / *L. peruviana* získaní od pacientů s CL ale i s MCL (Dujardin a kol. 1995, Nolder a kol. 2007). Mezi 27 izoláty, vykazujících hybridní fenotypické i genotypické znaky, bylo nalezeno 7 rozdílných mikrosatelitních genotypů, což mohlo vypovídat o více než jedné hybridizační události. Hybridní byli též popsáni jako možní původci MCL (Nolder a kol. 2007).

Vzácnost sexuálního křížení by mohla také odrážet skutečnost, že vzniklé hybridní progeny jsou detekovatelné, pouze když se u nich projevuje selektivní výhoda, jak kromě výše zmíněných příkladů napovídá i pozorování hybridů *L. braziliensis* / *L. guyanensis* ve Venezuele. Tito hybridní byli izolováni z pacientů s kožní leishmaniózou, která má ve Venezuele široké rozšíření. Hybridní izoláty vykazovaly na některých lokusech identické alely s *L. Braziliensis*, na jiných lokusech naopak s *L. guyanensis*. Objevení hybridů byli

popsáni jako další původci kožní leishmaniózy v endemických ohniscích Venezuely (Delgado a kol. 1997).



Obr. 1. Geografická distribuce popsaných mezidruhových a vnitrodruhových hybridů. Vložené obrázky: zelená fluorescence transgenních druhů *L. donovani* a vektor rodu *Phlebotomus* (převzato a upraveno z Miles a kol. 2009).

Ve Starém světě se vyskytuje několik druhů leishmanií podrodu *Leishmania*, zodpovědných za zdravotní komplikace od kožních, přes kožně – slizniční, až po viscerální. Mezi zdravotně nejdůležitější patří *L. major* (CL), *L. tropica* (CL), *L. aethiopica* (difúzní CL) a zejména komplex *L. donovani* (*L. infantum* a *L. donovani*), původce viscerální leishmaniózy (VL).

Jako první byli z východní provincie Saudské Arábie izolovaní hybridi *L. major* / *L. arabica* získaní z divokých zvířat nakažených kožní leishmaniózou (Kelly a kol. 1991). V této oblasti se *L. major* (infekční pro člověka i zvíře) a *L. arabica* (infekční pro psy a pískomily) vyskytují společně a jsou přenášeny *P. papatasi* (Evans a kol. 1987). Hybridy mezi těmito blízkými druhy byli popsáni na základě výsledků izoenzymatických analýz, molekulárního karyotypu a analýzy kDNA, která ukázala dědičnost minikroužků pouze

od *L. major*. Hybridi byli izoenzymaticky identičtí a to naznačuje, že byli výsledkem jedné sexuální události a následně šíření klonálně (Kelly a kol. 1991).

Hybridi byli objeveni také mezi fylogeneticky a epidemiologicky rozdílnými druhy leishmanií, a to *L. major* a *L. infantum* (Ravel a kol. 2006). *Leishmania infantum* se vyskytuje podél celé Středozevní pánve na vlhkých místech, vektorem je zpravidla *P. perniciosus* nebo jiné druhy podrodu *Larroussius* a rezervoárem je pes. Oproti tomu *L. major* se vyskytuje v suchých oblastech Afriky, Blízkého a Středního východu, vektorem je *P. papatasi* a *P. duboscqi* a rezervoárem jsou různé druhy pískomilů. Hybridi *L. major* / *L. infantum* byli izolováni v Portugalsku z imunosuprimovaných HIV pozitivních pacientů. Podle molekulárních (MLST) a izoenzymatických (MLEE) analýz zdědili hybridy kompletní genomy obou rodičů (Ravel a kol. 2006).

Vývoj těchto hybridů v přenašeči byl laboratorně testován v *P. papatasi*, který přenáší pouze *L. major*. Výsledkem experimentálních infekcí bylo, že hybridy v *P. papatasi* produkovali silné infekce a exprimovali lipofosfoglykan (LPG) stejného typu jako *L. major*. Lipofosfoglykan je důležitá povrchová molekula, která umožňuje *L. major* přichytit se na receptor PpGalec ve střevě *P. papatasi*, a zabránit tak vydefekování leishmanie ze střeva (Kamhawi a kol. 2004, Pimenta a kol. 1992). Zdá se, že LPG umožnil úspěšný vývoj i hybridům *L. major* / *L. infantum*. To dokazuje, že sexuální rekombinace zvyšuje potenciál přenosu a fitness leishmanií (Volf a kol. 2007).

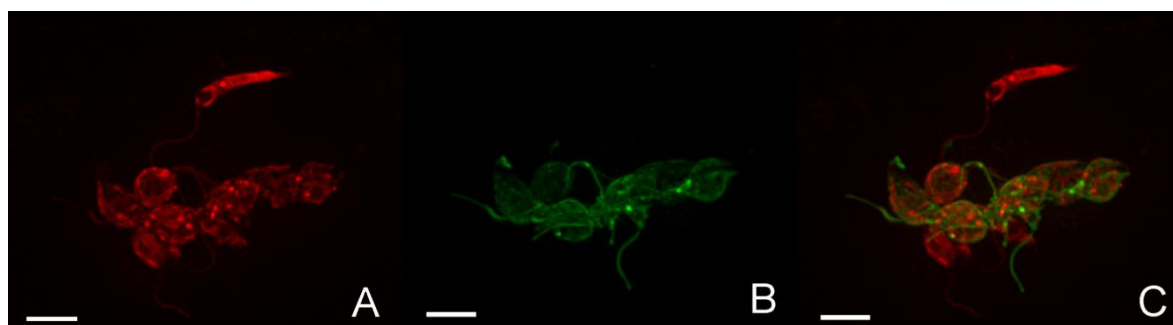
Kromě výše zmíněných interspecifických hybridů pochází ze Starého světa i důkazy o genetické události v rámci jednoho druhu (intraspecifické hybridy).

Možnost toku genů byla studována i v rámci populace *L. infantum* (*L. donovani* komplex) z Tunisu (Chargui a kol. 2009). *Leishmania infantum*, původce převážně viscerální leishmaniózy (méně často kožní leishmaniózy), se v této oblasti dělí do tří zymodermů (MONů): MON-1, MON-24, MON-80 (Belhadj a kol. 2002). MON-1 se dále dělí na evropský a tuniský (Chargui a kol. 2009).

Chargui a kol. (2009) testovali 27 kmenů *L. infantum* ze severního a centrálního Tunisu. Autoři užitím MLMT metody na základě rozdílných délek 14 mikrostaelitních markerů popsali hybridy existující mezi MON-1 ale i mezi odlišnými MONy, které se liší v patologii leishmaniózy. Objevili čtyři hybridy MON-1 / MON-24-80, které potvrdili molekulárními analýzami jednoho z těchto hybridů a jeho šesti klonů. Srovnání s rodičovskými populacemi MON-1, MON-24 a MON-80 ukázalo, že hybrid i jeho klony prezentují všechny populačně - specifické alely. Existence hybridů u *L. infantum* byla evidovaná i v Alžírsku, ale v tomto případě nebyli potencionální hybridy testovány analýzou jejich klonovaných potomků (Seridi

et al. 2008). Zdá se, že frekvence hybridizace u *L. infantum* je docela častá, z 27 kmenů *L. infantum* byli detekováni čtyři (14,8%) hybridní genotypy v Tunisu a z 82 testovaných kmenů mělo dvanáct (14,6%) hybridní genotyp v Alžírsku (Chargui a kol. 2009, Seridi a kol. 2008).

Experimentálními metodami byl testován i druh *L. donovani*. Přirození přenašeči *L. donovani*, *P. perniciosus* a *Lutzomyia longipalpis*, byli experimentálně nainfikováni geneticky pozměněnými leishmanii. Tyto kmeny *L. donovani* byly rezistentní k rozdílným ATB a nesly červený (RFP) nebo zelený fluorescenční protein (GFP). Infekční samice flebotomů byly v různých časových intervalech vypitvány a obsah střeva analyzován fluorescenční mikroskopií nebo metodou FACS (fluorescence-activated cell sorting), po níž následovala konfokální mikroskopie. Hybridi, kteří jednoznačně exprimovali RFP i GFP byli viděni v jediné samici obou testovaných typů vektorů. Jednalo se o krátké (procyklické) promastigoty v endoperitrofické oblasti střeva, kde se vyskytli již druhý den po experimentální infekci flebotomů (Obr. 2) (Sadlova a kol. 2011).



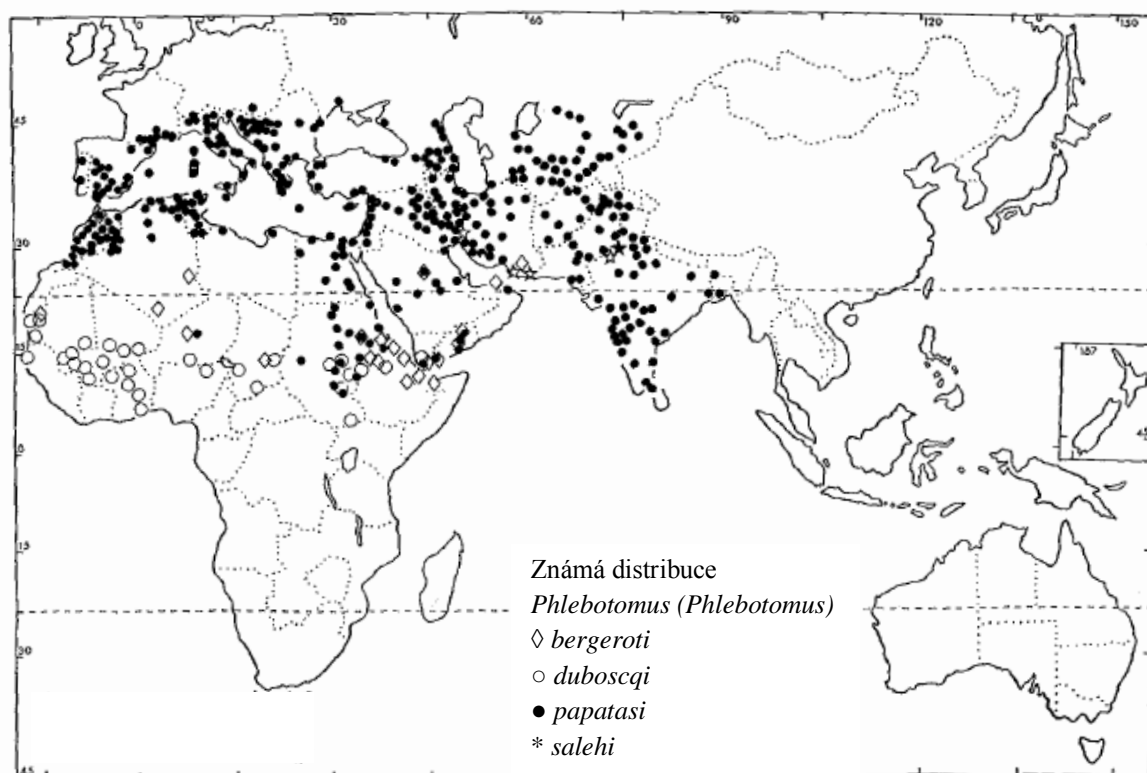
Obr. 2. Hybridní promastigoti ve střevě *P. perniciosus* 2 dny po infekci. A, B, C, skupina deseti hybridů společně se čtyřmi leishmanii, které vykazovaly pouze červenou fluorescenci (převzato a upraveno z Sadlova a kol. 2011).

2.3 *Leishmania turanica* a její společná ohniska s *Leishmania major*

Kožní leishmanióza způsobená *Leishmania major* se vyskytuje v různých státech Subsaharské Afriky, Severní Afriky, Středního východu, dále zasahuje až do Centrální Asie, Pákistánu a Indie. Hlavními přenašeči *L. major* jsou *Phlebotomus papatasi* a *P. duboscqi* (Obr. 3 a 4). Rezervoárovými zvířaty *L. major* jsou hlodavci podčeledi *Gerbillidae* (Pískomilové) (Gramiccia a Gradoni 2005).

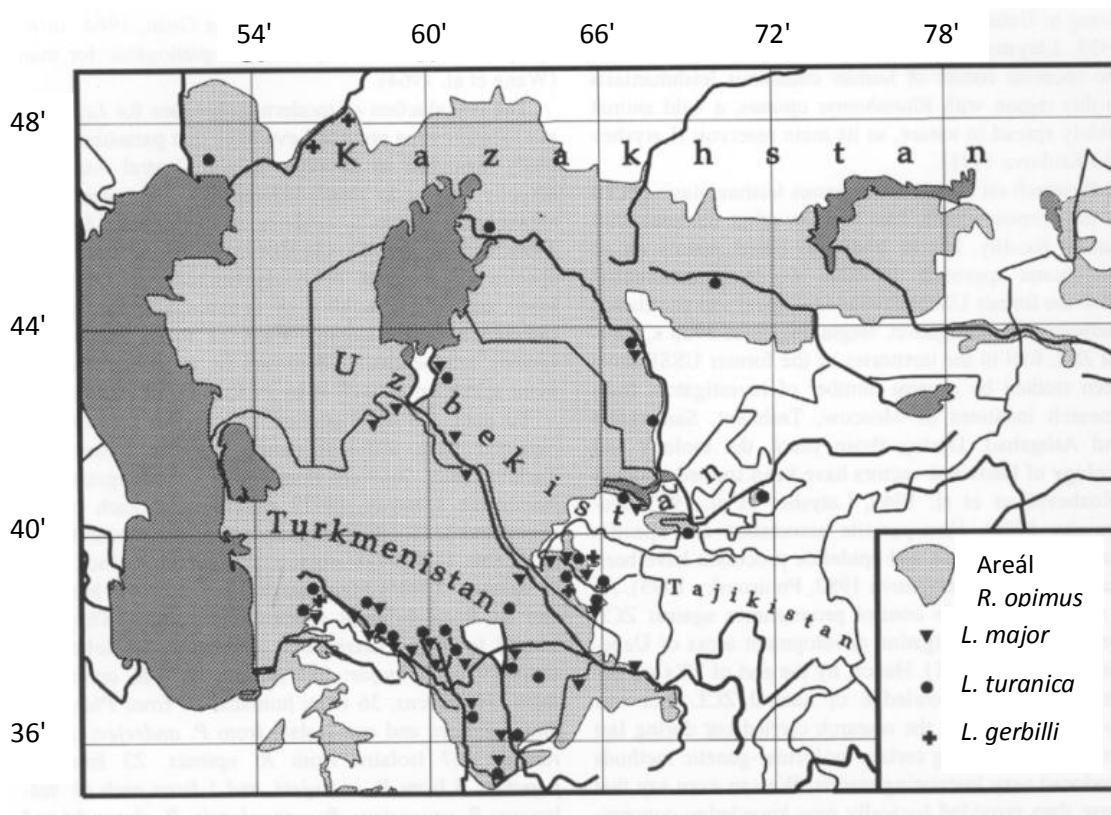


Obr. 3. Geografická distribuce kožní leishmaniózy způsobené *L. major* ve Starém světě (převzato z WHO 2010).



Obr. 4. Geografická distribuce *P. papatasi*, *P. duboscqi* a dalších druhů podrodu *Phlebotomus* (převzato a upraveno z Lewis 1982).

V ohniscích zoonotické kožní leishmaniózy v Centrální Asii se vyskytují tři rozdílné druhy leishmanií: *L. major*, *L. turanica* a *L. gerbilli*. Pro člověka je nepatogenní pouze *Leishmania gerbilli*. *Leishmania turanica* indukuje vznik spontánně se hojících kožních lézí, které trvají kratší dobu než léze způsobené *L. major* (Guan a kol. 1995, Strelkova a kol. 1990). Společným hostitelem těchto tří druhů leishmanií je pískomil *Rhombomys opimus*, jehož geografická distribuce zasahuje od Iránu a Afghánistánu přes Kazachstán do Číny a Mongolska (Musser a Carleton 2005). *Leishmania turanica* je rozšířená přes celý areál výskytu pískomila, zatím co areál výskytu *L. major* je podstatně užší. V jižní části areálu výskytu pískomila žijí všechny tři druhy leishmanií sympatricky (Strelkova 1996) (Obr. 5).



Obr. 5. Mapa rozšíření *L. major*, *L. turanica* a *L. gerbilli* v populaci *R. opimus* (převzato a upraveno z Strelkova 1996).

V přírodních ohniscích Uzbekistánu, jižního Kazachstánu, Turkmenistánu a Mongolska byla izolovaná smíšená infekce *L. major* a *L. turanica*. Oba druhy byly společně izolovány ze stejného rezervoárového zvířete, *Rhombomys opimus*, i ze stejného přenašeče *P. papatasi* (Strelkova a kol. 1990, Strelkova 1996). Z nedávných experimentálních infekcí *P. papatasi* se zdá, že se *L. major* a *L. turanica* vyvíjí v přenašeči velmi podobně.

Experimentální koinfekce s fluorescenčně značenou *L. major* a *L. turanica* potvrdily schopnost společného vývoje těchto druhů v *P. papatasi* a to bez viditelné známky vzájemné kompetice. Oblast vývoje ve střevě a schopnost kolonizace stomodeální valvy se mezi druhy výrazně neliší (Chajbullinova a kol. 2012, nepublikováno).

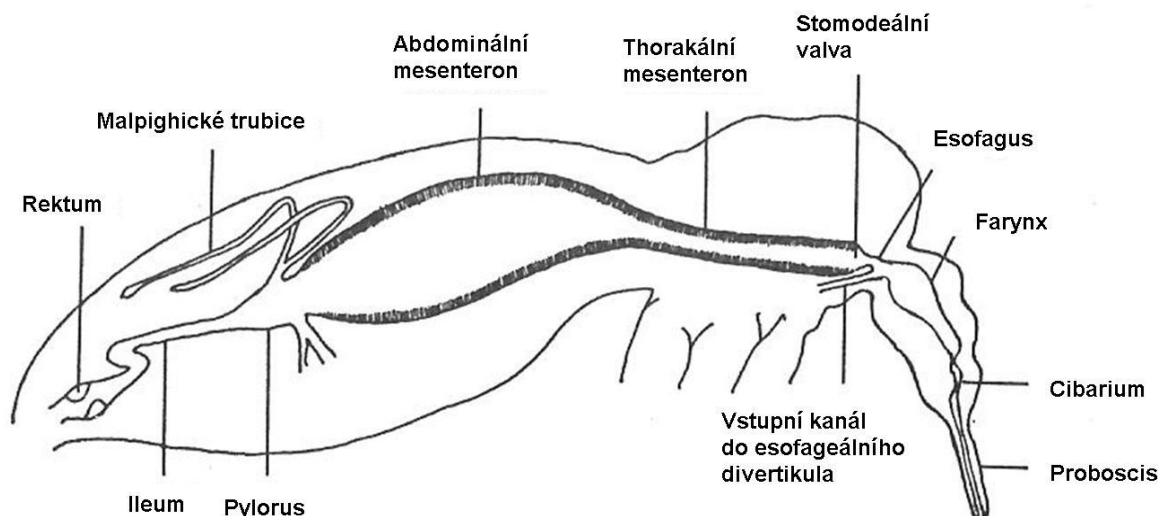
V ohniscích zoonotické kožní leishmaniózy (ZCL) v Turkmenistánu a Uzbekistánu je až 25% pískomilů nakaženo *L. turanica* i *L. major*, a tato koinfekce v pískomilech může přetrvávat až 25 měsíců. Oproti tomu u většiny pískomilů experimentálně nainfikovaných pouze *L. major* přetrvávala infekce maximálně 6 měsíců. Tato doba by v přirozených podmínkách nestačila k přečkání v rezervoáru do další přenosové sezóny, neboť v oblasti panují dlouhé zimy a sezonní aktivita flebotomů je omezena na období od srpna do září. Zdá se tedy, že koinfekce *L. major* / *L. turanica* v *Rhombomys opimus* umožňuje přetrvávání *L. major* v rezervoáru do další sezóny přenosu (Strelkova a kol. 2001).

Smišená infekce těchto druhů v pískomilech byla zjištěná i z ohniska ZCL v Iránu. Pískomilové jsou zde pravděpodobně klíčovými rezervoáry, jak naznačuje jejich abundance a míra infekce *L. major* a *L. turanica*. Stejně tak je zde klíčovým i přenašeč *P. papatasi* (Parvizi a Ready 2008, Mirzaei a kol. 2011, Rassi a kol. 2011, Akhavan a kol. 2010).

Ve své diplomové práci jsem se s otázkou možnosti genetické výměny zaměřila na *L. major* a *L. turanica* vzhledem k jejich společnému výskytu. Hybridi těchto příbuzných druhů nebyli z přírody dosud izolováni. Otázkou je, zda vznikají a nebyli dosud objeveni, nebo zda tyto druhy nehybridizují.

2.4 Vývoj *Leishmania major* v přenašeči

Leishmanie se vyznačují digenetickým životním cyklem, ve kterém střídají extracelulární vývoj v trávicím traktu bezobratlého vektora s intracelulárním vývojem v makrofázích obratlovců. Vývoj leishmanií ve flebotomovi probíhá v různých částech jeho trávicí trubice. Trávicí trakt flebotomů se dělí na 3 oblasti: přední střevo (stomodeum), které je lemované kutikulou stejně jako zadní střevo (proctodeum), a dále střední střevo (mesenteron) vystlané epitelem s mikrovily. Stomodeum se skládá z proboscis (sosák), cibaria (ústní dutina), faryngu (hltan), divertikula (vole), esofágu (jícen) a stomodeální valvy, která zabraňuje zpětnému toku z mezenteronu. Mesenteron se dělí na tenkou přední (thorakální) a širokou zadní (abdominální) část. Thorakální část mezenteronu je od stomodea oddělena stomodeální valvou a abdominální část je od proctodea oddělena pyrolickou valvou. Proctodeum je členěno na pylorus (z něhož vychází Malpighické trubice), ileum, rektální ampuli a rektum (Walters a kol. 1987) (Obr. 6).



Obr. 6. Schéma trávicího traktu flebotomů (převzato a upraveno z Killick-Kendrick 1979).

Vývoj podrodu *Leishmania* se odehrává v mezenteronu a stomodeu střeva flebotomů, proto tuto skupinu řadíme mezi tzv. suprapylaria (Lainson a Shaw 1987). Jelikož jsem v rámci diplomové práce studovala *L. major* patřící do této skupiny, vztahuje se následující text k vývoji suprapylárních leishmanií.

Samice rodu *Phlebotomus* se nakazí amastigoty leishmanií při sání na infekčním savčím hostiteli. Nasátá krev projde střevem do abdominálního mezenteronu, kde je obalena peritrofickou matrix (PM). Acelulární semipermeabilní PM je tvořena proteiny, glykoproteiny a chitinem. Je produkovaná střevním epitelem a slouží jako jeho ochrana před mechanickým a chemickým poškozením epitelu mezenteronu (Lehane 1997). Ovoidní amastigoti se mění na krátké elipsoidní procyklické promastigoty, kteří se následně několikanásobně množí. Druhý až třetí den se tyto formy transformují na protáhlé a velmi pohyblivé nektomonády. Po prasknutí peritrofické matrix se některé nektomonády reverzibilně přichycují bičíky mezi mikrovily, čímž zabraňují svému vypuzení ze střeva společně s nestrávenou krví. (Bates a Rogers 2004, Bates 2007). Přichycení nektomonád k epitelu mezenteronu umožňuje hlavní povrchový glykokonjugát lipofosfoglykan (LPG), který u *L. major* může být specificky vázán na lektin PpGalec *P. papatasi* (Kamhawi 2006, Kamhawi a kol. 2004).

Nektomonády jsou nedělicí se stádia, která se 4. den mění na krátké nektomonády, Rogers a kol. (2002) navrhuje termín leptomonády, které se dělí. Tyto krátké nektomonády

produkují promastigotní sekretorický gel (PSG), jehož hlavní složkou je fPPG (filamentous proteophosphoglycan) (Stierhof a kol. 1999, Rogers a kol. 2002). Některé nektomonády se mění na tzv. haptomonády, které se objevují 5. -7. den přichycené pomocí hemidesmosomů ke kutikule stomodeální valvy a v menší míře i ve stomodeu (esofág, farynx). Posledním stádiem vývoje jsou metacyklickí promastigoti vyskytující se ve velkém množství v přední části mezenteronu. Jsou charakterističtí malým tenkým tělem s více jak dvakrát tak dlouhým bičíkem, který jim umožňuje vysokou pohyblivost. Metacykly jsou nedělicí se a volně plovoucí stádia, která jsou infekční pro savčího hostitele, do jehož kůže se dostanou při dalším sání flebotoma na hostiteli (Bates a Rogers 2004, Bates 2007) (Obr. 7).

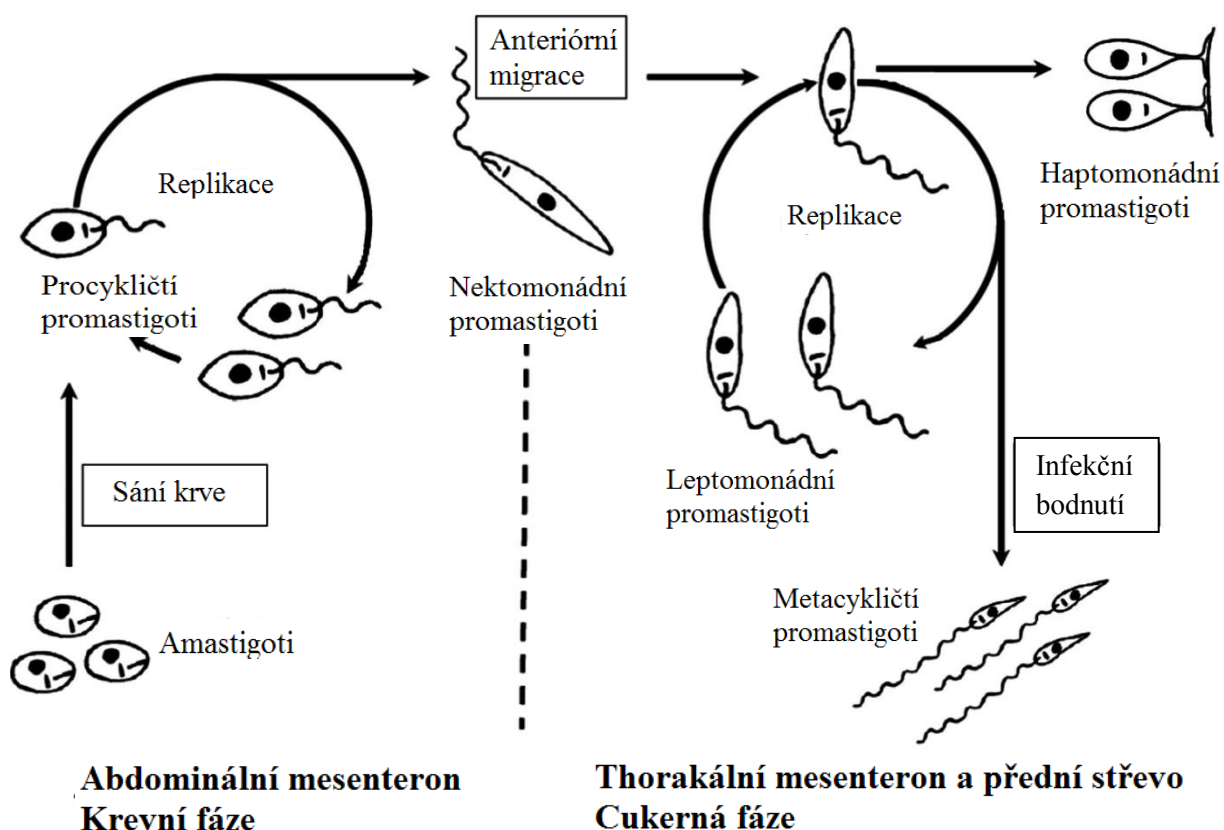
Stomodeální valva je za normálních okolností uzavřená a umožňuje průtok potravy pouze směrem do střeva. Při silné infekci leishmaniemi ale dochází k narušování cylindrických buněk stomodeální valvy a to působením chitinázové aktivity enzymů promastigotů (Schlein a kol. 1992, Volf a kol. 2004). Stomodeální valva tak zůstává otevřená a k přenosu dochází nejpravděpodobněji vyvracením metacyklických promastigotů do kůže při sání vektora. K přenosu také napomáhá výše zmíněný PSG, který ucpává přední část střeva. Flebotom má tak pravděpodobně potíže se sáním další krve a zkouší sát opakovaně, čímž se zvyšuje možnost přenosu leishmanií. Zdá se také, že doba sání nakaženého flebotoma vzrůstá s množstvím metacyklických promastigotů a akumulací PSG (Rogers a kol. 2004, Rogers a Bates 2007, Maia a kol. 2011).

Při studiu *L. major* jsme pracovali s vektory *P. papatasi* a *duboscqi*. Tyto dva blízce si příbuzné druhy podrodu *Phlebotomus* jsou hlavními přenašeči kožní leishmaniózy ve Starém světě (Killick-Kendrick 1999). Geografická distribuce *Phlebotomus papatasi* je široká a zahrnuje většinu území Starého světa, od Mediteránu, přes Blízký a Střední východ, Centrální Asii a Indii, v Africe pak zasahuje až do Súdánu a Etiopie. *Phlebotomus duboscqi* je rozšířený v celé Západní a Centrální Africe, jižně od Sahary (Lewis 1982, Killick-Kendrick 1999) (viz Kapitola 2.3, Obr. 5).

Phlebotomus papatasi a *P. duboscqi* byli porovnáváni z hlediska kompetence k rozdílným liniím *L. major*, které se lišily geografickým původem, virulencí pro myši a strukturou LPG. Výsledky nepřinesly signifikantní rozdíly a ukázaly, že míra infekce všech linií nezávisí na druhu přenašeče, ale pouze na linii *L. major* (Cihakova a Volf 1997).

Zdá se však, že *P. duboscqi* je účinnějším přenašečem než *P. papatasi*, alespoň v laboratorních podmínkách. Dospělci *P. duboscqi* žijí déle a přežití do druhého sání je u nich

pravděpodobnější než u *P. papatasi*. Také procento infikovaných samic *P. duboscqi* bylo sedmý den po sání vyšší než u *P. papatasi* (Mukhopadhyay a Ghosh 1999).



Obr. 7. Vývojová posloupnost pěti hlavních promastigotních forem: procyklický promastigot, nektomonádní promastigot, krátké nektomonády (leptomonádní promastigot), haptomonádní promastigot a metacyklický promastigot (převzato a upraveno z Bates 2007).

2.5 Role genů HASP / SHERP v metacyklogenezi leishmanií

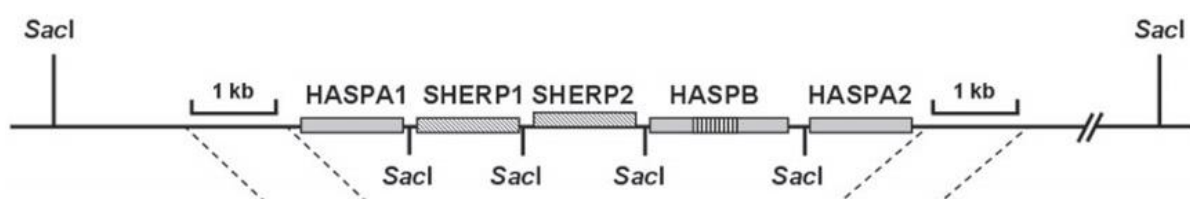
Metacyklogeneze je děj, který vede k vzniku infekčních metacyklických promastigotů v poslední fázi vývoje leishmanií v přenašeči (Sacks 1989). In vitro je metacyklogeneze indukována kyselejšími prostředím (Zakai a kol. 1998) a nedostatkem pteridin reduktázy, který vede k poklesu množství tetrahydrobiopterinu (vedlejší produkt při redukci diopterinu pteridinovou reduktázou) (Kumar a kol. 2007, Cunningham a kol. 2001).

Mezi specifické molekuly, jejichž exprese se mění při metacyklogenezi, patří dvě hlavní povrchové molekuly parazitů, a to LPG (lipofosfoglykan) a GP63 (leishmanolysin). GP63 protein je metaloproteináza ukotvená pomocí GPI kotvy (glykosylfosfatidylinositol) a hojně se vyskytující na povrchu promastigotů. Účastní se přímé interakce s receptory makrofágů a

komplementem hostitele (Joshi a kol. 2002). Molekula LPG je nejhojnější povrchový glykokonjugát promastigotů. Zahrnuje řetězec opakujících se fosforylovaných disacharidových jednotek (-Gal-Man-PO₄-), které jsou k podkladu přichyceny přes GPI kotvu. U LPG dochází během metacyklogeneze k chemickým změnám. U *L. major* se při tomto procesu zvyšuje počet Man-Gal disacharidů kostry ze 14 na 30. Metacykličtí promastigoti s takto modifikovaným LPG volně plavou ve střevě, jsou připraveni k přenosu a odolní ke komplementu obratlovce (McConville a kol. 1992, Kamhawi 2006, Turco a Descoteaux 1992).

Při studiu mechanismu, který spouští metacyklogenezi, bylo identifikováno několik genů, které jsou exprimovány pouze u infekčních stádií a pravděpodobně jsou do tohoto děje zapojeny. U rodu *Leishmania* jsou takovými geny HASP kódující HASP proteiny (hydrophilic acylated surface protein) a SHERP kódující proteiny SHARP (small hydrophilic ER-associated protein). Tyto geny leží ve stejné oblasti chromozomu 23 (konkrétně na LmcDNA16 lokusu), která obsahuje geny HASPA1, HASPA2 a HASPB a geny SHARP1 a SHERP2 (McKean a kol. 2001) (Obr. 8).

Zatímco HASP geny jsou exprimovány na povrchu metacyklů a amastigotů, SHERP geny jsou exprimovány pouze u metacyklů. Protein HASPB je charakteristický opakováním aminokyselinových domén, HASPA (nejmenší z HASP proteinů) tuto repetici postrádá. (McKean a kol. 1997a, McKean a kol. 1997b, Knuepfer a kol. 2001). Funkce těchto genů pomocí mutantních linií *L. major* studoval McKean a kol. (2001) a Sadlova a kol. (2010).



Obr. 8. Schéma LmcDNA16 lokusu (převzato a upraveno z McKean a kol. 2001).

McKean a kol. (2001) porovnávali kontrolní (wild type) *L. major* s liniemi, kterým buď chyběl celý LmcDNA16 lokus (KO linie), nebo byl tento lokus KO linii vrácen do episomu buňky (+cDNA16 linie), což způsobilo syntetizování více příslušných proteinů (overexprese). Dále ke studiu použili KO linii doplněnou pouze o HASPB / SHERP geny (+HASPB /

+SHERP linie). Autoři zjistili, že KO linie je in vitro schopna metacyklogeneze a při invazi makrofágů je nejméně tak virulentní jako FVI linie. Linie KO dále způsobovala léze u myší o 1-2 týdny později než FVI. Oproti tomu +cDNA16 linie byla zcela avirulentní, nebyla schopna přežít prostředí makrofágů a nezpůsobovala léze u myší.

Rozdílné výsledky však byly získány při vývoji výše zmíněných mutantů *L. major* v *P. papatasi* (Sadlova a kol. 2010). Autoři použili navíc i novou linii Kin (LmcDNA16 lokus vrácen zpět ke KO, tentokrát ale do jádra). KO linie nebyla schopná produkovat metacyklická stadia v přenašeči. Navíc u ní bylo pozorované snížené množství krátkých promastigotů a slabá kolonizace stomodeální valvy (SV) v pozdní fázi infekce. Naopak Kin linie navracela parazitům schopnost metacyklogeneze i kolonizace SV. Linie +HASP / +SHARP částečně obnovovala původní fenotyp. Podle této studie jsou tedy HASP a SHERP geny nezbytně nutné pro metacyklogenezi. Autoři se tak domnívají, že *L. major* postrádající lokus LmcDNA16 nebude schopná přenosu vektorem na savčího hostitele (Sadlova a kol. 2010).

V této práci jsme se proto na základě nedávných výsledků pokusili o experimentální přenosy mutantních linií *L. major* sáním dvou druhů přenašečů. Zajímalo nás, zdali bez metacyklů dojde k přenosu leishmanií a jak se budou linie vzájemně v přenosech lišit.

3 MATERIÁL A METODIKA

Tato kapitola je rozdělena na dvě části podle metodiky odpovídající konkrétnímu experimentu.

3.1 Experimentální koinfekce *L. major* a *L. turanica* pro detekci hybridů

3.1.1 Použité druhy leishmanií a jejich kultivace

K pokusům byla použita kultura *L. major* WHOM/IR/-/173 Ds RED (RFP⁺) značená červeným fluorescenčním proteinem a kultura *L. turanica* MRHO/MN/08/BZ18 (GFP⁺) značená zeleným fluorescenčním proteinem. Obě kultury jsou uchovávány v kryobance v zamrazovacích ampulích CryoTube™ Vials (NUNC) v médiu, které obsahuje 5–10% kryoprezervační látky DMSO (Sigma-Aldrich).

Leishmanie byly kultivovány v tekutém médiu v mikrozkuvkách při 23°C. Kultivační médium pro *L. major* obsahuje médium RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) a Schneiderovo D-médium (Lonza) v poměru 3:1, inaktivované telecí fetální sérum (10% celkového objemu, Vinco) a amikin (250 µl/ml; Bristol-Myers Squibb). Ke kultivačnímu médiu pro *L. turanica* bylo navíc přidáno selekční antibiotikum nourseothricin (100 µl/ml; LEXSY NTC, Jena Bioscience).

3.1.2 Chov flebotomů

K experimentálním infekcím byly použity dva druhy flebotomů, *Phlebotomus papatasi* a *P. duboscqi*, z kolonií dlouhodobě chovaných v naší laboratoři. Kolonie jsou chovány při teplotě 25°C, 70% vlhkosti a s fotoperiodou 14 hodin světla a 10 hodin tmy. Dospělí flebotomové jsou drženi v nylonových sítích a je jim podáván roztok 50% sacharózy. Jednou za týden jsou samice sáté na laboratorní myši uspané intraperitoneálně anestezií, která obsahovala 4ml 10% ketaminu (Narketan; Vétoquinol) a 2ml 2% xylazinu (Rometer; Spofa). Po defekaci jsou samice přemístěny k vykladení do plastových kelímků vylitých sádkou. Vylíhnuté larvy jsou krmeny kompostovanou a rozemletou směsí králičích pelet a trusu (1:1). Chov flebotomů je podrobně popsán například v publikaci Volf a Volfová 2011.

3.1.3 Experimentální infekce

Samice flebotomů (5–7 dní staré) byly infikovány sáním defibrinované králičí krve smíchané s promastigoty leishmanií. K experimentálním infekcím byly použity 3–5 dní staré kultury *L. major* a *L. turanica*, které byly dvakrát promyty ve fyziologickém roztoku

a naředěny na koncentraci 10krát vyšší (10^7 promastigotů/ml krve) než byla požadovaná výsledná koncentrace leishmanií v krvi. Přesná koncentrace buněk byla spočítána pomocí Bürkerovy komůrky. Leishmanie byly smíchány s defibrinovanou a inaktivovanou (35–40 min ve vodní lázni v 56 °C) králíčí krvi (Bioveta) v poměru 1 : 9 (300 μ l kultury a 2700 μ l krve). Výsledná koncentrace leishmanií v krvi byla poté 1×10^6 leishmanií/ml krve. Směs leishmanií a krve byla naplněna sterilní skleněná krmítka potažená membránou z kuřecí kůže. Kůže ze zad mrtvého třídenního kuřátka byla 2x po 10 minutách promyta v etanolu a 2x po 10 minutách ve fyziologickém roztoku. Obsah krmítka byl zahříván vodní lázni s vnější cirkulací na 37°C. Na krmítka byla zavěšena síťka se samicemi flebotomů, které sály ve tmě 2 hodiny. Poté byla síťka opatrně sundána. Nasáté infekční samice byly vytrženy do nové sítěky a uchovány v termostatu při 26°C.

3.1.4 Pitva střev samic flebotomů, světelná a fluorescenční mikroskopie

Nasáté samice *P. papatasi* (1. série pokusů) nebo *P. duboscqi* (2. série pokusů) byly vypitvané 2., 9., popřípadě 14. den po infekci a zkontrolovány na přítomnost leishmanií. Samice byly uspané na ledu a po zbavení končetin byly vloženy do kapky fyziologického roztoku na podložním skle. Střeva byla pitvacími nástroji (minucie zapíchnuté do špejle) vypreparována pod binokulární lupou. Nejprve se samicím oddělila hlava od zbytku těla a tahem byly odděleny dva poslední články abdomenu. Část infekčních střev byla zkontrolována pod světelným mikroskopem (Olympus CX31) na přítomnost leishmanií a pod fluorescenčním mikroskopem (Olympus BX51) na intenzitu fluorescence leishmanií ve střevě. U ostatních byla vypreparovaná střeva (30 až 50 kusů) dána do mikrozkušavky s 15 μ l fyziologického roztoku. Mikrozkušavka se střevy byla společně s kontrolami (GFP⁺ leishmanie, RED⁺ leishmanie a leishmanie bez fluorescenčního signálu) převezena tentýž den na AV v Krči k detekci případných hybridů pomocí metody FACS (Fluorescence activated cell sorting) a konfokálního mikroskopu.

3.1.5 Analýza metodou FACS a konfokální mikroskopie

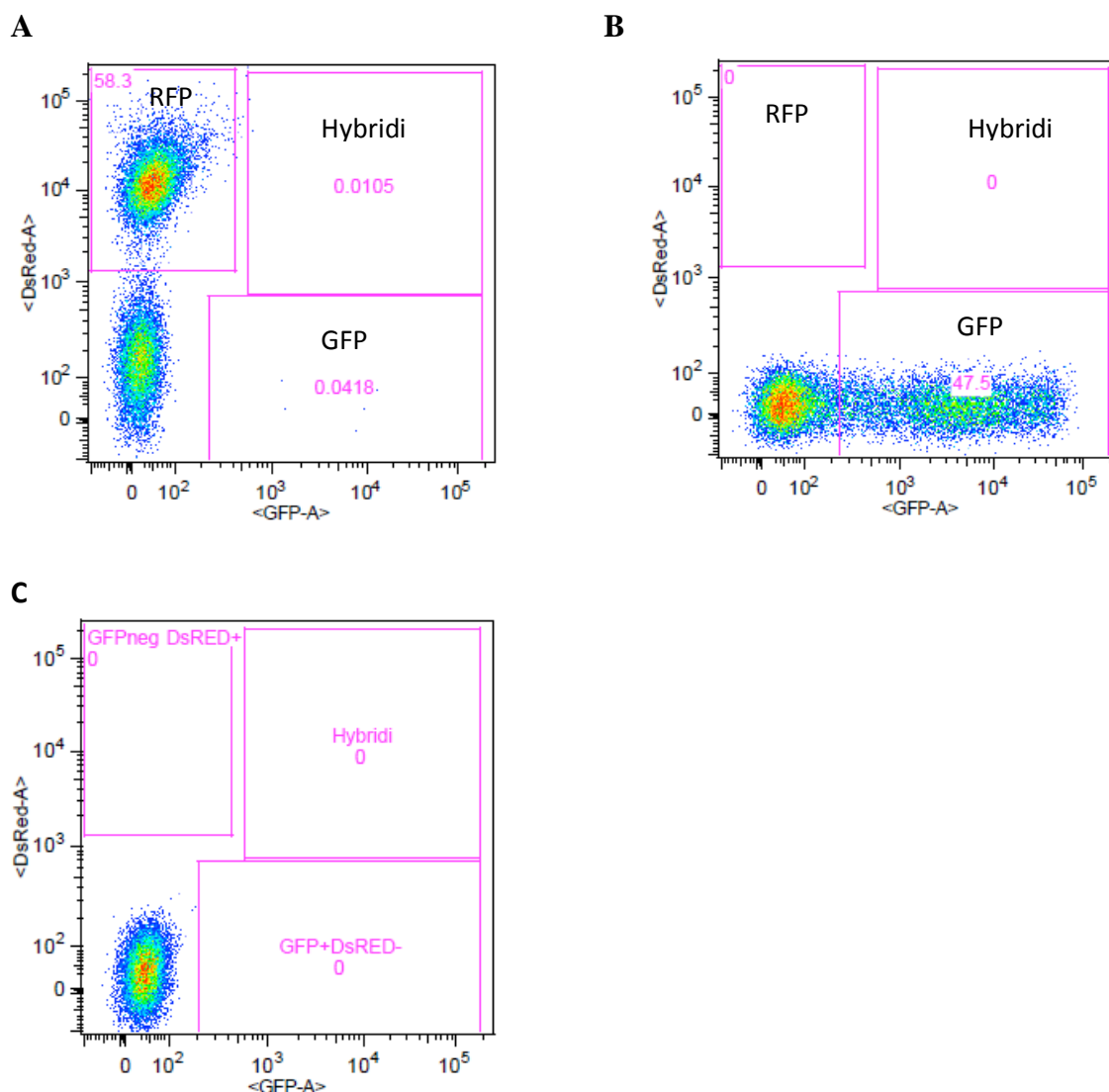
Vypreparovaná střeva byla homogenizována a přefiltrována pomocí 30 μ m filtru (Partec) do PBS pufru a analyzovaná průtokovou cytometrií na přístroji LSRII (BD Biosciences) na přítomnost hybridů. Fluorescence GFP pozitivních buněk byla excitována laserem o vlnové délce 488 nm a detekovaná filtrem o vlnové délce 530/30 nm. Fluorescence RFP pozitivních buněk byla excitována laserem o vlnové délce 561 nm a detekovaná filtrem o vlnové délce 585/15 nm. Samotné sortování potencionálních hybridních buněk bylo provedeno pomocí

FACS Vantage SE cell sorteru (1. série pokusů) nebo cytometru BD Influx (2. série pokusů). Všechny tři cytometry byly nastaveny pomocí jednobarevných pozitivních kontrol (GFP⁺ a RFP⁺) a na základě negativní kontroly. Po nastavení byly sortovací cytometry schopny rozeznat a oddělit GFP⁺ buňky, RFP⁺ buňky, negativní buňky a potencionální hybridní buňky exprimující obě fluorescence (Obr. 9).

Pokusy byly provedeny ve dvou sériích, které se lišily druhem flebotoma a typem průtokového cytometru.

První série případných hybridních buněk obsahující GFP⁺ i RFP⁺ ze střev *P. papatasi* byla sortována pomocí FACS Vantage SE cell sorter (BD Biosciences). Z technických důvodů byla fluorescence GFP i RFP pozitivních buněk detekována na základě excitace laserem o vlnové délce 488 nm a detekována filtrem o vlnové délce 530/30 nm (GFP) a 585/42 nm (RFP). Sortování buněk probíhalo ve dvou krocích. V prvním kroku, tzv. presortu, byly nejdříve separovány všechny GFP pozitivní buňky. Ve druhém kroku se z těchto buněk vysortovaly buňky s dvojitě pozitivním signálem, a to do kapky glycerolu obsahujícím 1% formaldehyd. Ihned poté byly vysortované buňky kontrolovány pod konfokálním mikroskopem (Olympus FV1000). Pod mikroskopem je třeba rozlišit hybridní buňky nesoucí současně zelený i červený fluorescenční signál a vyloučit artefakty s fluorescenčním signálem (zbytky střeva, krystalky z krve a slepené buňky leishmanií k sobě). Hybridní buňky i artefakty se v okuláru fluorescenčního mikroskopu jeví jako žluté.

Druhá série potencionálních hybridních buněk ze střev *P. duboscqi* byla sortována pomocí přístroje BD Influx cell sorter (BD Biosciences). Fluorescence GFP pozitivních buněk byla excitována laserem o vlnové délce 488 nm a detekována filtrem o vlnové délce 530/40 nm. Fluorescence RFP pozitivních buněk byla excitována laserem o vlnové délce 561 nm a detekována filtrem o vlnové délce 585/29 nm. Každý laser tak rozsvítí jeden fluorescenční signál a separace dvojitě pozitivních buněk proběhne v jednom kroku. Cytometr je schopen optimální excitace RFP buněk, které již není nutné přeměřovat na LSRII cytometru, jako v předešlé sérii pokusů. Dále je cytometr schopen vyššího průtoku, proto není nutné dělat presort. Vysortovaný materiál se analyzoval stejným způsobem jako u první série konfokálním mikroskopem (Olympus FV1000).



Obr. 9. Nastavení FACS podle kontrol: **A.** RFP⁺ leishmanie, **B.** GFP⁺ leishmanie, **C.** negativní kontrola.

3.2 Experimentální přenosy mutantních linií *L. major* na myš sáním *P. papatasi* a *P. duboscqi*

3.2.1 Použité druhy leishmanií a jejich kultivace

K pokusům byla použita kultura *Leishmania major* Friedlin (MHOM/IL/81/Friedlin/VI; FVI) a její dvě mutantní linie, které byly získány z laboratoře prof. D. Smith z Centre for Immunology and Infection at the University of York. První mutantní linie značená KO (Δ cDNA16::HYGR/ Δ cDNA16::PACR) postrádala LmcDNA16 lokus, jedná se o tzv. nulové mutanty. Druhá mutantní linie značená HASPB (Δ cDNA16::HYGR/ Δ cDNA16::PACR/ Δ HYGR::HASPB+NEOR) byla vytvořena tím

způsobem, že nulovým mutantům (KO) byl vrácen zpět do původního místa v chromozomu gen HASPB společně s genem pro rezistenci na neomycin. Kontrolní linii (wild type) jsme značili FVI.

Všechny tři kultury byly uchovávány v kryobance v zamrazovacích ampulích CryoTube™ Vials (NUNC) a v médiu, které obsahuje 5–10% kryoprezervační látky DMSO (Sigma-Aldrich). Leishmanie byly kultivovány v tekutém kultivačním médiu v mikrozkuvkách při 23°C. Kultivační médium pro *L. major* obsahuje médium M199 (Sigma-Aldrich), inkativované telecí fetální sérum (10% celkového objemu; Vinco) a amikin (250µg/ml; Bristol-Myers Squibb). Ke kultivačnímu médiu pro mutantní *L. major* (HASPB a KO) bylo navíc přidáno antibiotikum neomycin (40µg/ml; Sigma-Aldrich).

3.2.2 Myši

Pro krátkodobé pokusy, při nichž byla myš po experimentálním přenosu infekce ihned zabita, byly použity BALB/c myši z chovu naší laboratoře. Ke dlouhodobým pokusům, při nichž se myš několik měsíců sledovala, byly použity osmi týdenní myši BALB/c odkoupené od firmy AnLab. Během pokusů byly všechny myši chovány ve zvěřinci katedry parazitologie za stálých teplotních i nutričních podmínek.

3.2.3 Experimentální infekce flebotomů

K experimentálním infekcím byly použity dva druhy flebotomů, *Phlebotomus papatasi* a *P. duboscqi*. Pro každou linii *L. major* bylo den před experimentální infekcí přemístěno z kolonií do malých sítěk (20 x 20 cm) 120 - 170 samic flebotomů. Celkem jsme měli pro každý pokus tři malé síťky flebotomů popsané FVI, KO, HASPB a každou jsme nainfikovali příslušnou linii leishmanií. Metodika chovu flebotomů a experimentální infekce je totožná s kapitolou 3.1.2 a 3.1.3.

Myši byly během pokusů uspané intraperitoneálně anestezií, která obsahovala 4ml 10% ketaminu (Narketan; Vétoquinol) a 2ml 2% xylazinu (Rometer; Spofa).

3.2.4 Infekční přenosy na myš

Do sítě s infikovanými samicemi flebotomů byla položena uspaná myš a to na dobu jedné hodiny (Obr. 10). S *P. papatasi* se přenosy prováděly 8. až 21. den po infekci, s *P. duboscqi* 8. až 26. den po infekci. Každá nasátá samice flebotoma byla ihned po dokončení sání přemístěna aspirátorem do kelímku na ledu a po usnutí přenesena do připravených a popsaných mikrozkuvek se 100µl elučního pufru (Roche). Místo na myši

a doba sání každé samice byly zakresleny a zapsány do protokolu. Myš byla usmrcena, místa sání flebotomů byla pitvacími nástroji dána do mikrozkmavek a všechny vzorky s flebotomy i tkáněmi byly do izolace DNA uschovány v -70°C . U dlouhodobých pokusů mohly samice flebotomů sát pouze na uších. Myši byly v tomto případě usmrceny až po 4 měsících sledování vzniku lézí.

Myši z dlouhodobých pokusů byly jednou týdně sledovány v místě sání flebotomů a vytvořená léze měřena digitálním posuvným měřítkem. Změny velikosti léze byly zapisovány do protokolu. Myši byly usmrceny 114. až 120. den po infekci. Z těla byly vypitvány pomocí pítvacích nástrojů místa sání na uších (případně nosu), pravá a levá spádová mízní uzlina, slezina a část jater. Vzorky byly nastříhány na menší kousky a dány do připravených a popsanych mikrozkmavek se 100 μl elučního pufru a do izolace DNA skladovány v -70°C .



Obr. 10. Uspaná myš během experimentálního přenosu mutantních linií *L. major* sáním přenašeče rodu *Phlebotomus*.

3.2.5 Izolace DNA a kvantitativní PCR (qPCR)

K izolaci DNA z flebotomů a myších tkání byl použit High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) a DNA byla extrahována dle protokolu výrobce. Vyizolovaná DNA byla eluována do 100 μl elučního pufru (Roche) a skladována při teplotě -20°C .

Množství leishmanií ve flebotomech a v myších tkáních bylo stanoveno pomocí kvantifikace vyizolované DNA s využitím kvantitativní PCR (qPCR). Ta je založena na detekci vznikajícího dvouvláknového produktu (amplikonu) prostřednictvím metody SYBER Green (iQSYBER Green Supermix, Bio-Rad, Hercules, CA) na přístroji iQ5 real-time PCR

detection system (Bio-Rad). Byl amplifikován gen pro glukóza-6-fosfát dehydrogenázu (G6PD) s využitím primerů G6PD-LLF (5'-CTTTTCTGGTCCTCCGGGTAGG-3') a G6PD-LLR (5'-CCACCCGGCCCTATTTTACACCAA-3'). DNA z neinfekčního flebotoma a myši posloužila jako negativní kontrola. Výsledky byly vyhodnoceny Kruskal-Wallis testem (program STATISTICA verze 6.0). Kvantitativní PCR byla provedena a statisticky vyhodnocena doc. RNDr. Janem Votýpkou, Ph. D.

3.2.6 Morfologická analýza buněk leishmanií

Roztěry pro barvení a následné měření buněk byly připraveny 10. nebo 11. den po infekci z vypitvaných střev *P. duboscqi*. Deset střev od každé skupiny (FVI, HASPB, KO) bylo pitváno na podložním skle ve fyziologickém roztoku. Střeva byla poté rozmáčknuta a rozetřena krycím sklem. Preparáty byly po zaschnutí nafixovány metanolem, po vypaření metanolu 20 minut barveny 20x naředěným roztokem Giemsy-Romanovského (Giemsa stain, Fluka) a opláchnuty vodou.

Tři vybrané preparáty z každé linie byly při celkovém zvětšení 1000x prohlédnuty pod světelným mikroskopem (Olympus BX51) se zabudovanou kamerou (DP-70) za použití imerzního oleje. Z každého preparátu bylo nafoceno 40 buněk pomocí programu DP Controller (Olympus). Délka buňky, délka bičíku a šířka buňky (v nejširší části) byly měřeny programem ImageJ (Java). Získaná data byla vyhodnocena v programu SPSS. Rozměry buněk a zastoupení jednotlivých forem byly porovnávány Chi-square testem. Korelace počtu přenosu s počtem metacyklických stádií byla vyhodnocena pomocí Fisherova testu.

Jednotlivé formy jsme rozdělili na tři kategorie podle Sadlova a kol. (2010):

1. Dlouhé nektomonády: délka těla $\geq 14 \mu\text{m}$
 2. Metacyklickí promastigoti: délka bičíku \geq než dvojnásobek délky těla, délka těla $< 14 \mu\text{m}$
 3. Krátkí promastigoti: délka bičíku $<$ než dvojnásobek délky těla, délka těla $< 14 \mu\text{m}$
- Haptomonády zde nejsou rozlišovány, protože zůstávají přichycené na střevě a nemohou tak být v roztěru měřeny.

4 VÝSLEDKY

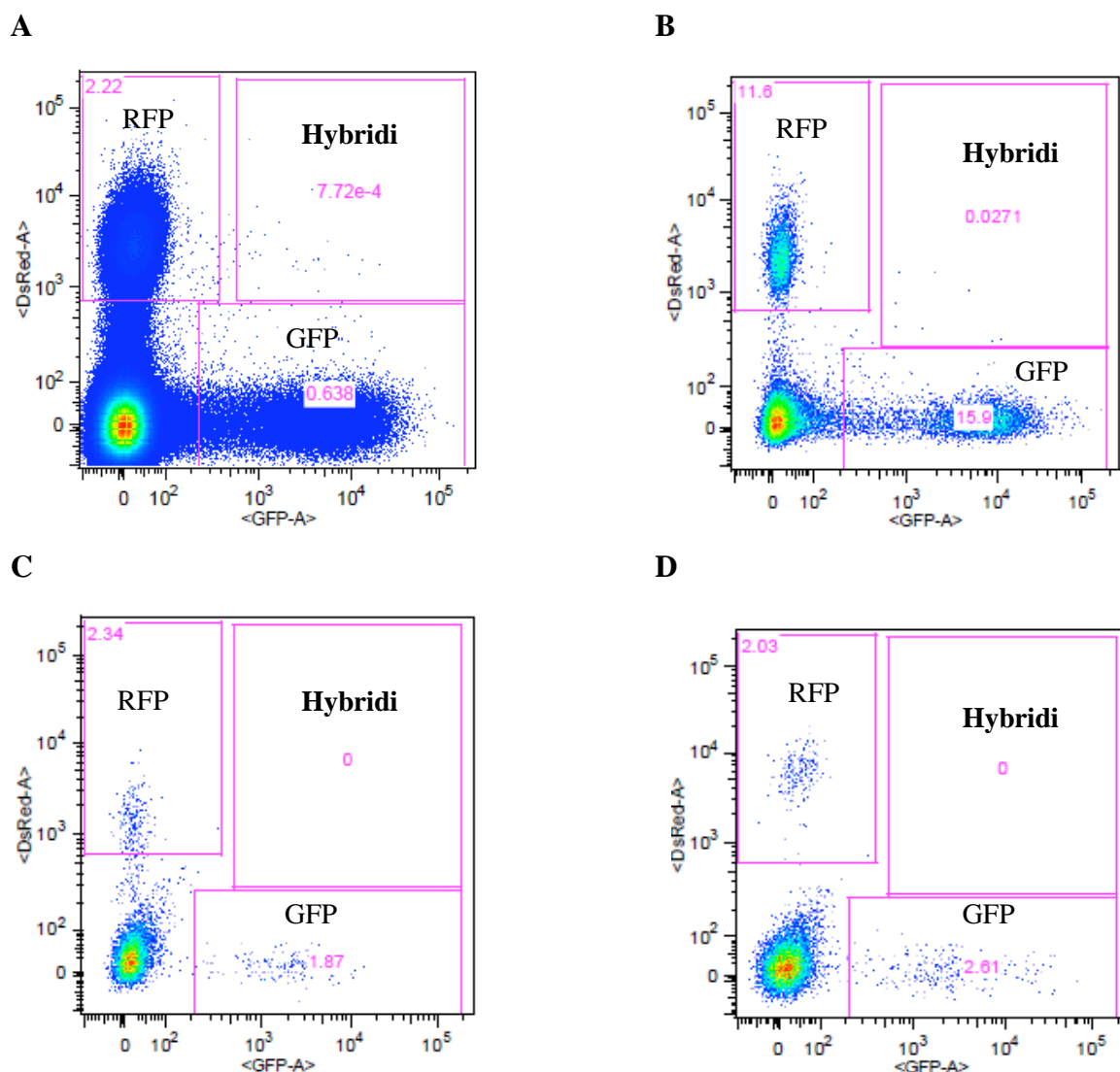
4.1 Experimentální koinfekce a detekce hybridů metodou FACS

Pět až sedm dní staré samice *Phlebotomus papatasi* / *duboscqi* byly nainfikovány *L. major* a *L. turanica*. Infekčním samicím byla vždy druhý, devátý, popřípadě čtrnáctý den po infekci vypitvána střeva. Směsný vzorek 30 až 50 střev byl zhomogenizován. Experimentální infekce byly provedeny třikrát (2 x s *P. papatasi*, 1 x s *P. duboscqi*).

V první sérii pokusů, která zahrnuje dvě infekční sání, bylo celkem vypitváno 180 infekčních samic *Phlebotomus papatasi*, a to 2. a 9. den po infekci (DPI). Potencionálně hybridní buňky byly sortované pomocí FACS Vantage SE cell sorter, kde sortování buněk s GFP i RFP fluorescencí probíhá ve dvou krocích (viz. Kapitola Materiály a metody). Množství fluorescenčně značených *L. major* a *L. turanica* bylo výrazněji rozdílné pouze v jednom ze dvou pokusů, kdy se *L. major* (RFP) pomnožila 3,5x lépe než *L. turanica* (GFP). Druhý den po sání bylo vysortováno celkem 39 potencionálních hybridních buněk. Z tohoto počtu nebyla pod konfokálním mikroskopem potvrzena žádná leishmanie s oběma fluorescenčními signály. Devátý den po infekci bylo GFP a RFP buněk mnohem méně. Devátý den po infekci nebyl vysortován žádný potencionální hybrid. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 1 a znázorněny na obrázku 11.

Tab. 1: Počty jednotlivých buněk z první série pokusů, *P. papatasi*.

DPI	Experimentální koinfekce	Počet střev	GFP ⁺	RFP ⁺	Poměr GFP ⁺ : RFP ⁺	Potencionální hybridy
2	1.	50	25597	89285	1 : 3,5	31
9	1.	30	173	216	1 : 1,2	0
2	2.	50	4704	3441	1,4 : 1	8
9	2.	50	270	210	1,3 : 1	0

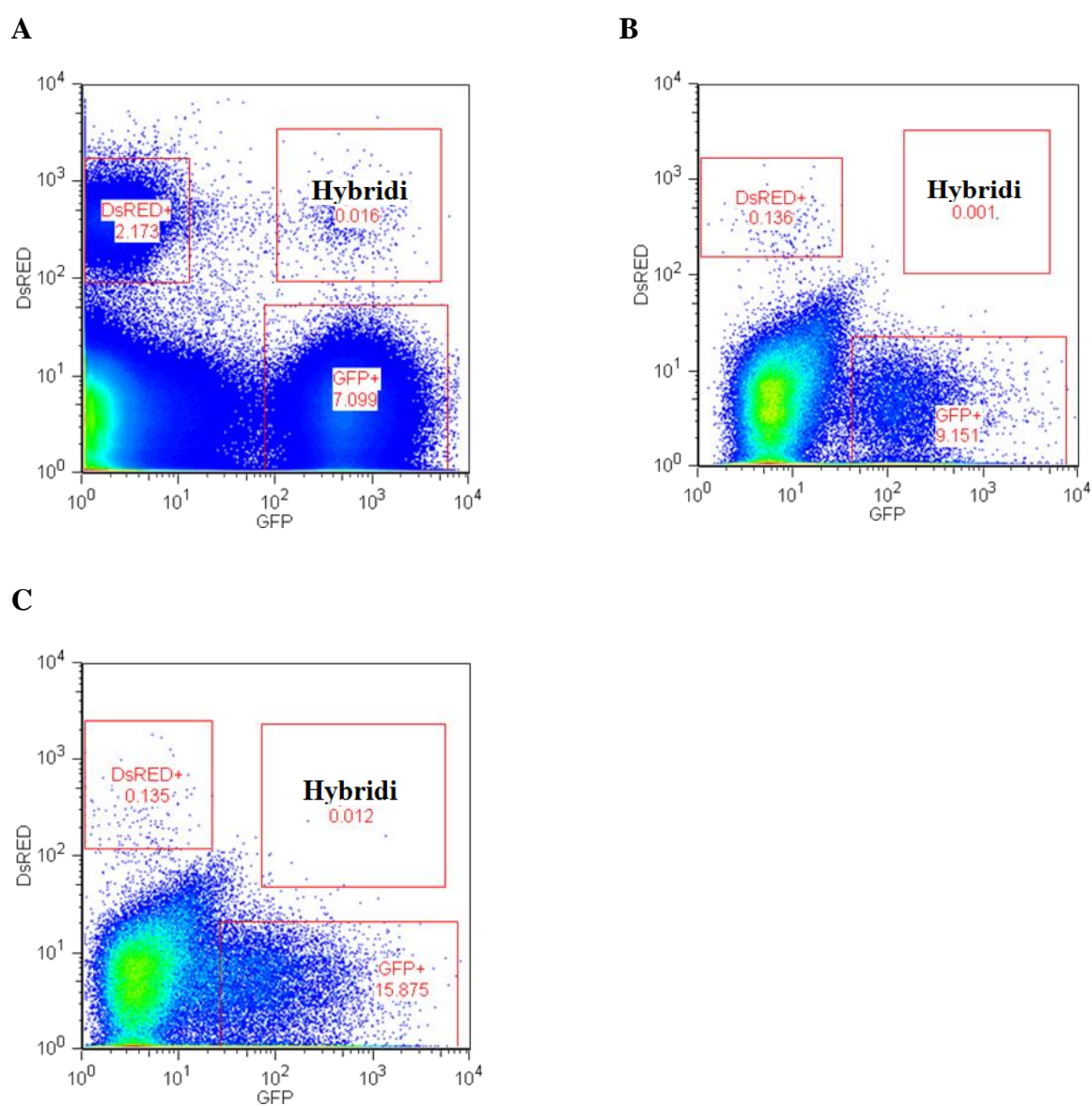


Obr. 11. Výsledky FACS analýzy, *P. papatasi*: **A, B** Hlavní sort, *P. papatasi*, 2. DPI; **C, D** Hlavní sort, *P. papatasi*, 9. DPI.

Ve druhé sérii bylo vypitváno 130 infekčních samic *Phlebotomus duboscqi*, a to 2., 9. a 14. den po infekci. Vzorek byl testován pomocí cytometru BD Influx (viz. Kapitola Materiály a metody). Množství fluorescenčně značených *L. major* a *L. turanica* bylo opakovaně rozdílné. Především v pozdější fázi infekce se *L. turanica* (GFP) množila v *P. duboscqi* výrazně lépe než *L. major* (RFP). Druhý den po infekci bylo vysortováno 711 potencionálních hybridů, 9. den po infekci jeden potencionální hybrid a 14. den po infekci 13 potencionálních hybridů. Z více jak 700 potencionálních hybridů nebyl pod konfokálním mikroskopem potvrzen žádný hybrid, jednalo se pouze o artefakty. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 2 a znázorněny na obrázku 12.

Tab. 2. Počty jednotlivých buněk, *P. duboscqi*.

DPI	Experimentální koinfekce	Počet střev	GFP+	RFP+	Poměr GFP ⁺ : RFP ⁺	Potencionální hybridi
2	1.	50	318983	97576	3,3 : 1	711
9	1.	50	12474	185	67 : 1	1
14	1.	30	16813	143	118 : 1	13



Obr. 12. Výsledky analýzy FACS, *P. Duboscqi*, **A.** 2. DPI, **B.** 9. DPI, **C.** 14. DPI.

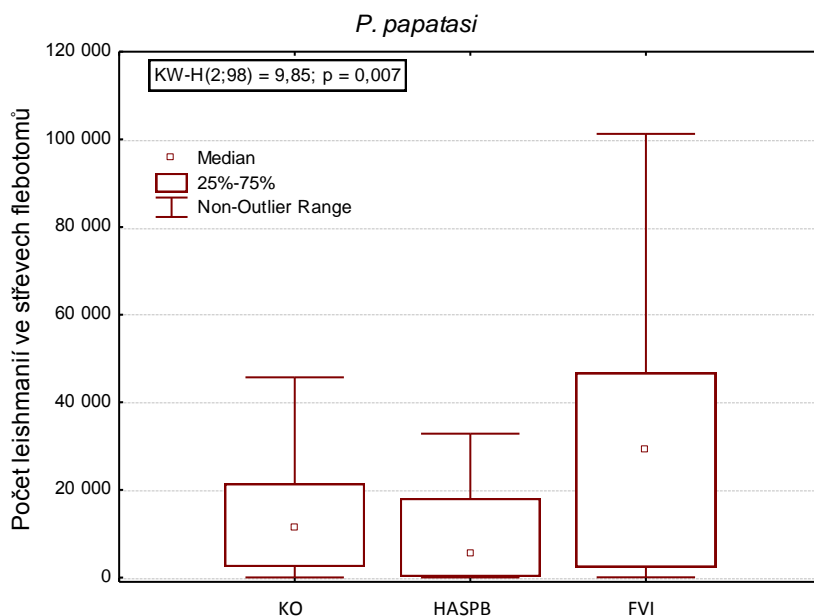
Z celkového počtu 310 vyšetřených samic *Phlebotomus papatasi* a *duboscqi*, nebyli nalezeni žádní hybridi, a to jak druhý, tak ani devátý a čtrnáctý den po infekci. U buněk, které byly pomocí FACS metody vysortovány a považovány za hybridní, se ukázalo, že se jedná pouze o žlutě fluoreskující zbytky střev, krystalky z média.

4.2 Experimentální přenosy mutantních linií *L. major* na myš sáním

P. papatasi

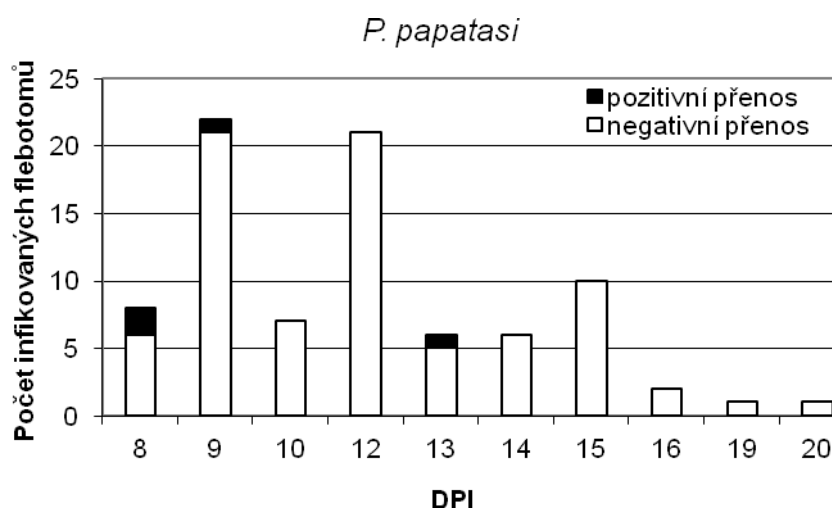
Při experimentálních infekcích jsme každou skupinu předem vytříděných samic nainfikovali odlišnou linií *L. major*. Pokusy byly provedeny čtyřikrát a infekční dávka byla vždy 1×10^6 buněk / ml krve. Intenzita infekce všech linií byla pouze po prvním infekčním sání dostatečně vysoká na to, aby se přenosy prováděly se všemi liniemi *L. major*.

V rámci všech čtyř pokusů a dnů po infekci byly mezi samicemi *P. papatasi*, nakažených jednotlivými liniemi *L. major*, pozorované signifikantní rozdíly v intenzitě infekce (KW-H: $p = 0,007$). Největší počet leishmanií ve střevě flebotoma byl zaznamenán u linie FVI. V porovnání mutantních linií se signifikantně lépe množila linie KO ($p = 0,027$) než linie HASPB. Výsledek je znázorněn na obrázku 13. Intenzity infekce jsme dále porovnávali mezi jednotlivými pokusy a to bez ohledu na typ linie. Intenzity infekce u nakažených flebotomů se lišily na hranici signifikance (KW-H (3,98) = 7,63; $p = 0,054$).



Obr. 13. Srovnání intenzity infekce jednotlivými liniemi *L. major* u infikovaných samic *P. papatasi*. Zahrnuty všechny čtyři experimenty a dny po infekci.

S experimentálními přenosy na myši jsme začínali 8. nebo 9. den a končili 15. – 21. den po infekci. Celkem bylo použito 34 myší. Z celkového počtu 122 samic *P. papatasi*, které se nasály na myši, bylo 28 samic nakaženo *L. major* FVI, 23 samic bylo nakaženo *L. major* HASPB a 33 samic bylo nakaženo *L. major* KO. Přenos leishmanií do myši kůže byl pozitivní ve čtyřech případech, a to 8., 9. a 13. den po infekci (Obr. 14). Množství přenesených leishmanií je ale ve všech čtyřech případech velmi malé. Linie FVI zaznamenala v porovnání s mutanty největší úspěšnost přenosu (7,1%). Přenesla se ve dvou případech a to v počtu kolem 10 buněk na jedno sání. *Leishmania major* HASPB se na myš přenesla v jednom případě (4,4%) v počtu zhruba 10 buněk a *L. major* KO (3%) se na myš přenesla v jednom případě v počtu zhruba 20 buněk. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 3.



Obr. 14. Počet úspěšných přenosů z celkového množství infikovaných *P. papatasi*, kteří sáli na myši v různých dnech po infekci (DPI).

Tab. 3. Výsledná data z přenosů *L. major* na myš sáním *P. papatasi*.

Experiment	Linie <i>L. major</i>	Počet flebotomů		Pozitivní přenos	Úspěšnost přenosu (%)
		Sátých na myši	Z toho infikováno		
1.	FVI	20	14	2	14,3 %
	HASPB	18	14	1	7,1 %
	KO	32	30	1	3,3 %
2.	FVI	10	5	0	0
3.	HASPB	16	9	0	0
4.	FVI	17	9	0	0
	KO	9	3	0	0
Suma	FVI	47	28	2	7,1 %
	HASPB	34	23	1	4,4 %
	KO	41	33	1	3,0 %

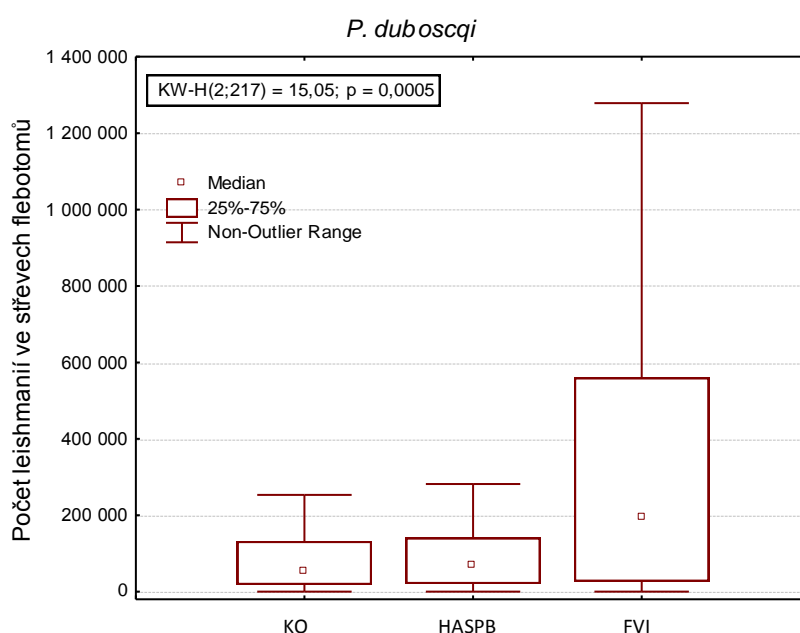
4.3 Experimentální přenosy mutantních linií *L. major* na myš sáním *P. duboscqi*

Při experimentálních infekcích s *P. duboscqi* jsme použili různé infekční dávky. Intenzita infekce byla po každém infekčním sání dostatečně vysoká na to, abychom mohli provést přenosy se všemi třemi liniemi *L. major*.

4.3.1 Infekční dávka 1×10^6 buněk / ml krve

Při shrnutí všech tří pokusů a dnů po infekci byly mezi samicemi *P. duboscqi*, nakažených jednotlivými liniemi *L. major*, pozorované signifikantní rozdíly v intenzitě infekce (KW-H: $p = 0,0005$), přičemž největší počet leishmanií ve střevě flebotoma zaznamenala linie FVI. Rozdíl v intenzitě infekce mezi mutantními liniemi nebyl statisticky průkazný ($p > 0,05$). Výsledek je znázorněn na obrázku 15.

Dále jsme porovnávali intenzity infekcí mezi jednotlivými pokusy, a to neohledně na typ linie *L. major*. Intenzity infekce u nakažených flebotomů se signifikantně lišily (KW-H $(2,217) = 22,89$; $p = 0,00001$), přičemž největší intenzita infekce byla zaznamenána ve 3. pokusu.

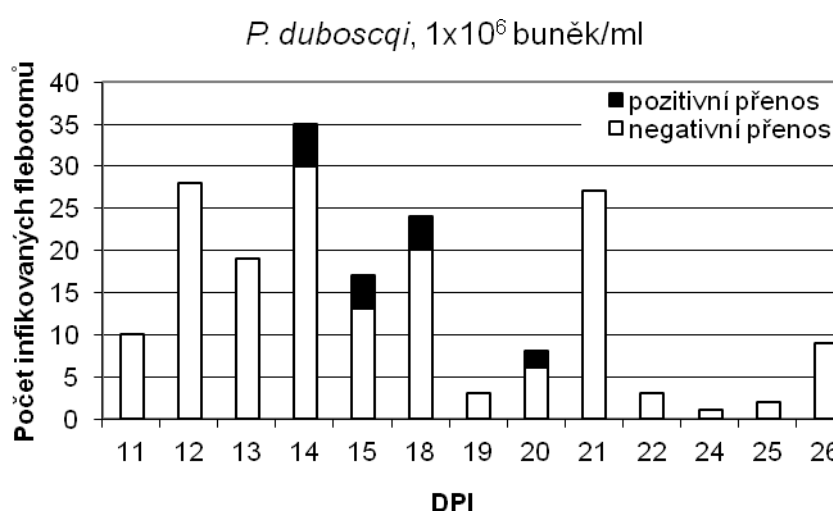


Obr. 15. Srovnání intenzity infekce jednotlivými liniemi *L. major* u infikovaných samic *P. duboscqi*. Infekční dávka 1×10^6 buněk/ml krve. Zahrnutý všechny tři experimenty a dny po infekci.

S experimentálními přenosy na myši jsme začínali 8. nebo 11. den a končili 21. – 26. den po infekci. Celkem bylo použito 58 myší. Z celkového počtu 205 samic *P. duboscqi*, které sály na myši, bylo 51 samic nakaženo *L. major* FVI, 50 samic bylo nakaženo *L. major* HASPB a 70 samic bylo nakaženo *L. major* KO.

Přenos leishmanií do myší kůže byl celkově pozitivní v patnácti případech, a to 14., 15., 18. a 20. den po infekci (Obr. 16). V deseti případech byl přenos pozitivní pro linii FVI. Inokulované množství leishmanií do kůže během jednoho sání se pohybovalo v rozmezí 15 – 8600 buněk, průměrný počet se přibližoval spodní hranici přenesených leishmanií. V pěti případech byl přenos pozitivní pro linii KO, ale počet přenesených leishmanií během jednoho sání byl značně menší (rozmezí 5 – 51 buněk) než u linie FVI. Úspěšnost přenosu při shrnutí všech tří experimentů byla 19,6% pro linii FVI; 7,1% pro linii KO a v rámci linie HASPB byl přenos nulový. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 4.

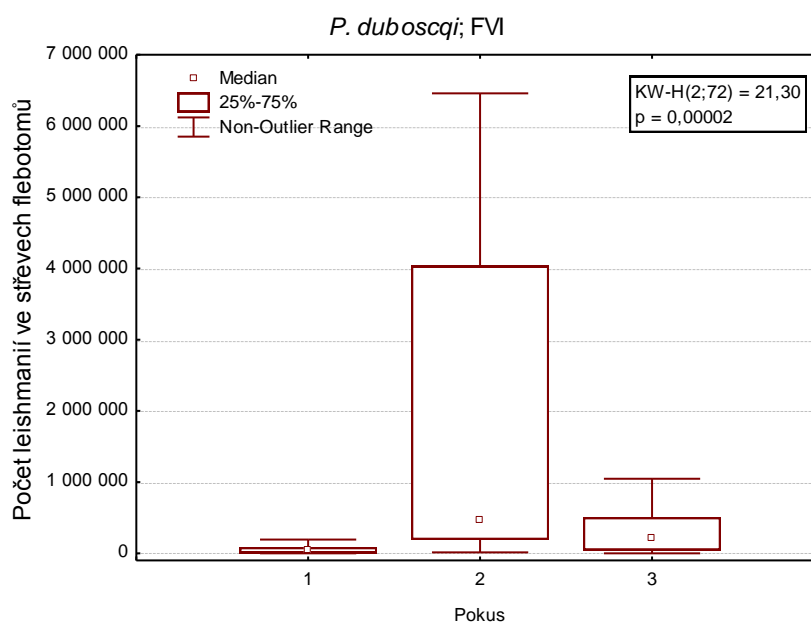
Všech deset případů úspěšného přenosu *L. major* FVI bylo výsledkem druhého experimentu (55,5% přenášejících samic). Proto jsme porovnali množství leishmanií FVI ve střevě flebotomů mezi jednotlivými pokusy. Výsledek signifikantně ukázal největší intenzitu infekce u druhého experimentu (KW-H: $p = 0,0002$), viz obrázek 17. Závislost počtu přenesených leishmanií FVI na počtu leishmanií ve střevě flebotoma ve druhém pokusu zjištěna nebyla (KW-H: $p = 0,41$), viz obrázek 18. Stejně tak nebyla u flebotomů s *L. major* FVI ze druhého pokusu zjištěna závislost na době sání a počtu přenesených leishmanií, ani na době sání a síle infekce ve střevě flebotoma (KW-H: $p > 0,05$).



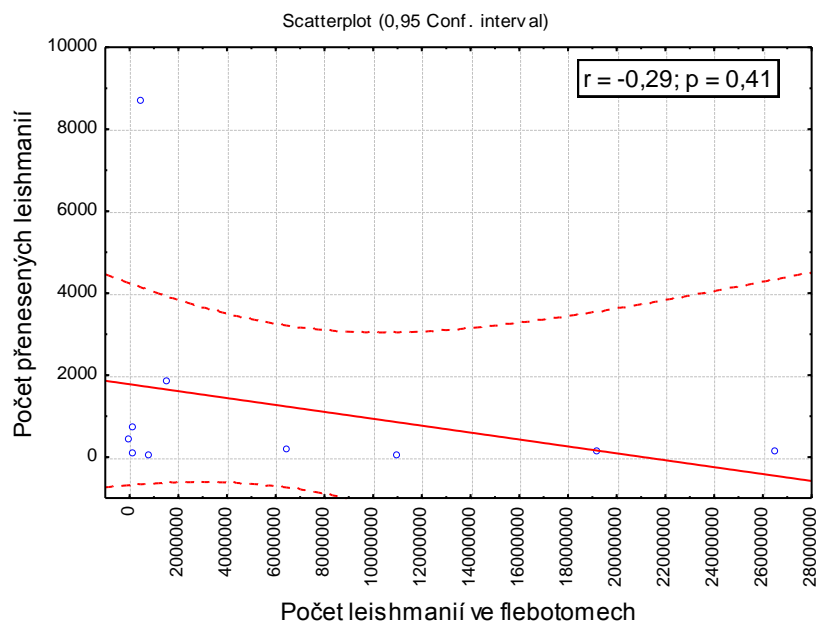
Obr. 16. Počet úspěšných přenosů z celkového množství infikovaných *P. duboscqi*, kteří sáli na myši v různých dnech po infekci (DPI). Infekční dávka 1×10^6 buněk/ml.

Tab. 4. Výsledná data z přenosů *L. major* na myš sáním infikovaných samic *P. duboscqi*. Infekční dávka 1×10^6 buněk/ml krve.

Experiment	Linie <i>L. major</i>	Počet flebotomů		Pozitivní přenos	Úspěšnost přenosu (%)
		Sátých na myši	Z toho infikováno		
1.	FVI	23	17	0	0
	HASPB	22	16	0	0
	KO	20	15	0	0
2.	FVI	21	18	10	55,5 %
	HASPB	37	27	0	0
	KO	22	19	1	5,3 %
3.	FVI	16	16	0	0
	HASPB	7	7	0	0
	KO	37	36	4	11 %
Suma	FVI	60	51	10	19,6 %
	HASPB	66	50	0	0
	KO	79	70	5	7,1 %



Obr. 17. Počet *L. major* FVI ve střevě *P. duboscqi* v jednotlivých pokusech. Zahrnutý všechny dny po infekci.



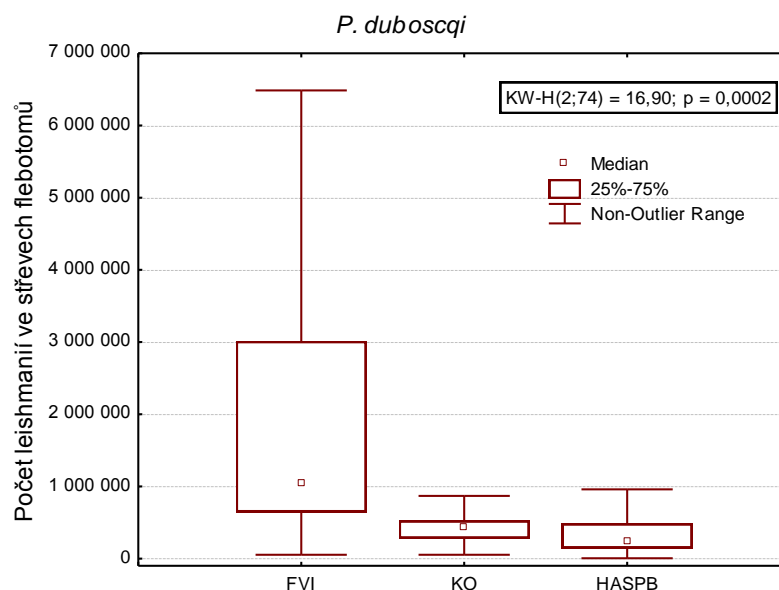
Obr. 18. Závislost počtu přenesených *L. major* FVI na počtu leishmanií ve střevě *P. duboscqi*.

4.3.2 Infekční dávka 1×10^7 buněk / ml krve

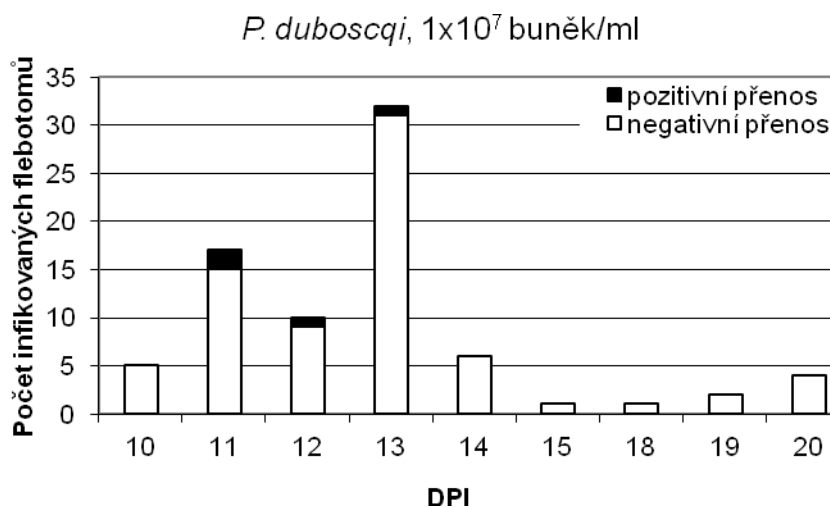
Při porovnávání intenzity infekce jednotlivými liniemi *L. major* u nakažených samic *P. duboscqi* byly pozorované signifikantní rozdíly (KW-H: $p = 0,0002$). Největší počet leishmanií ve střevě flebotoma byl zaznamenán u linie FVI. Rozdíl v intenzitě infekce mezi mutantními liniemi nebyl statisticky průkazný ($p > 0,05$). Výsledek je znázorněn na obrázku 19.

S experimentálními přenosy na myši jsme začínali 10. den a končili 20. den po infekci. Celkem bylo použito 20 myší. Z celkového počtu 106 samic *P. duboscqi*, které šly na myši, bylo 17 samic nakaženo *L. major* FVI, 33 samic bylo nakaženo *L. major* HASPB a 24 samic bylo nakaženo *L. major* KO.

Přenos leishmanií do myší kůže byl celkově pozitivní v šesti případech, a to 11., 12. a 13. den po infekci (Obr. 20). Ve čtyřech případech byl přenos pozitivní pro linii FVI a ve zbylých dvou případech byl přenos pozitivní pro linii KO. Úspěšnost přenosu linie FVI byla 23,5 %, linie KO 8,3 % a v rámci linie HASPB byl přenos nulový. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 5. Samice *P. duboscqi* nakažené linií FVI inokulovali do myší kůže během jednoho sání 100 – 1650 leishmanií. Průměrný počet se přibližoval spodní hranici přenesených leishmanií. U flebotomů infikovaných linií KO byla inokulovaná dávka v rozmezí 280 – 1080 leishmanií.



Obr. 19. Srovnání intenzity infekce jednotlivými liniemi *L. major* u infikovaných samic *P. duboscqi*. Infekční dávka 1×10^7 buněk / ml krve. Zahrnuty všechny dny po infekci.



Obr. 20. Počet úspěšných přenosů z počtu infikovaných *P. duboscqi*, kteří sáli na myši v různých dnech po infekci (DPI). Infekční dávka 1×10^7 buněk/ml.

Vzhledem k nevelkému nárůstu procenta pozitivních přenosů při 10x vyšší infekční dávce nás zajímalo, zdali vyšší infekční dávka zvýšila intenzitu infekcí samic. Srovnání intenzity infekce ukázalo, že u každé linie *L. major* byla intenzita infekce signifikantně vyšší při infekční dávce 1×10^7 buněk/ml krve (linie FVI: KW-H (1;69) = 10,8; $p < 0,001$; linie KO: KW-H (1;93) = 36,5; $p < 0,0001$; linie HASPB: KW-H (1;84) = 20,2; $p < 0,0001$).

Tab. 5. Výsledná data z přenosů *L. major* na myš sáním infikovaných samic *P. duboscqi*. Infekční dávka 1×10^7 buněk / ml krve.

Experiment	Linie <i>L. major</i>	Počet flebotomů		Pozitivní přenos	Úspěšnost přenosu (%)
		Sátých na myši	Z toho infikováno		
1.	FVI	28	17	4	23,5 %
	HASPB	44	33	0	0
	KO	34	24	2	8,3 %

4.4 Morfologie mutantních linií *L. major* v přenašeči *P. duboscqi*

Zastoupení jednotlivých stádií bylo porovnáváno mezi liniemi FVI, HASPB a KO při infekční dávce (ID) 1×10^6 a 1×10^7 buněk/ml.

Jedenáctý den (ID: 1×10^6 buněk/ml) a desátý den (ID: 1×10^7 buněk/ml) po experimentální infekci mutantními liniemi *L. major* byly připraveny preparáty ze střev infikovaných samic *P. duboscqi*. Obarveným buňkám byla měřena délka těla, délka bičíku a šířka těla. Jednotlivé rozměry jsou uvedeny v tabulce 9, 10. Podle morfologických znaků byly buňky rozděleny na tři vývojová stádia:

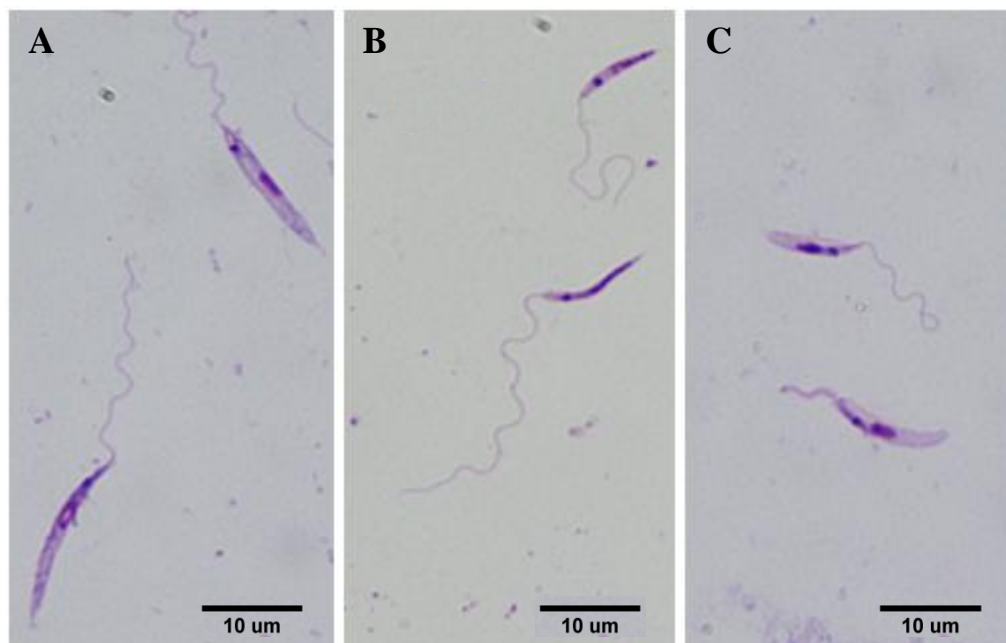
1. Dlouhé nektomonády: Obr. 21A
2. Metacykličtí promastigoti: Obr. 21B
3. Krátkí promastigoti: Obr. 21C

Během přípravy preparátů pro každou linii a infekční dávku (20 preparátů na linii) jsme si poznačili míru kolonizace stomodeální valvy (SV). Linie FVI silně kolonizovala SV ve všech dvaceti případech. Linie HASPB kolonizovala SV ve třetině případů ale jen slabě. Linie KO stomodeální valvu nekolonizovala ani v jednom případě.

Všechny tři linie *L. major* se v zastoupení jednotlivých buněčných forem signifikantně liší, a to jak při infekční dávce 1×10^6 buněk/ml ($\chi^2 = 126,2$; d.f. = 4; $p < 0,0001$), tak při infekční dávce 1×10^7 b/ml ($\chi^2 = 197,8$; d.f. = 4; $p < 0,0001$). V obou případech vytváří nejvíce metacyklických promastigotů linie FVI. Zastoupení metacyklických promastigotů u linií HASPB a KO je přibližně stejně nízké při obou infekčních dávkách. Výsledné počty jsou shrnuty v tabulce 8.

V rámci linie *L. major* FVI je v počtech jednotlivých buněčných forem mezi infekčními dávkami signifikantní rozdíl ($\chi^2 = 17,202$; d.f. = 2; $p < 0,0001$). Více metacyklických promastigotů je tvořeno při vyšší infekční dávce. U linie HASPB a KO nejsou rozdíly mezi infekční dávkou průkazné (HASPB: $\chi^2 = 4,535$; d.f. = 2; $p = 0,153$; KO: $\chi^2 = 4,529$; d.f. = 2;

$p = 0,104$). Nárůst procentuální úspěšnosti přenosů při vyšší infekční dávce však nekoreluje s vyšším počtem metacyklických stádií, rozdíl je statisticky neprůkazný (FVI: $p = 0.486$; KO: $p = 0.582$).



Obr. 21. Morfologická stádia *L. major* (zvětšeno 1000x). A. dlouhé nektomonády, B. metacyklickí promastigoti, C. krátkí promastigoti.

Tab. 8. Počty morfologických forem mutantních linií *L. major* dle infekční dávky.

Linie	Formy	Infekční dávka	
		1×10^6 (%)	1×10^7 (%)
FVI	Dlouhá nektomonáda	14 (11,7)	10 (8,3)
	Metacyklický promastigot	55 (45,8)	86 (71,7)
	Krátký promastigot	51 (42,5)	24 (20)
	Celkem	120	120
HASPB	Dlouhá nektomonáda	66 (55)	50 (41,7)
	Metacyklický promastigot	2 (1,7)	4 (3,3)
	Krátký promastigot	52 (43,3)	66 (55)
	Celkem	120	120
KO	Dlouhá nektomonáda	74 (61,7)	60 (50)
	Metacyklický promastigot	6 (5)	4 (3,3)
	Krátký promastigot	40 (33,3)	56 (46,7)
	Celkem	120	120

Tab. 9. Rozměry morfologických forem linií *L. major* FVI, HASPB a KO během vývoje v *P. duboscqi* 11. den po infekci. Infekční dávka 1×10^6 buněk/ml.

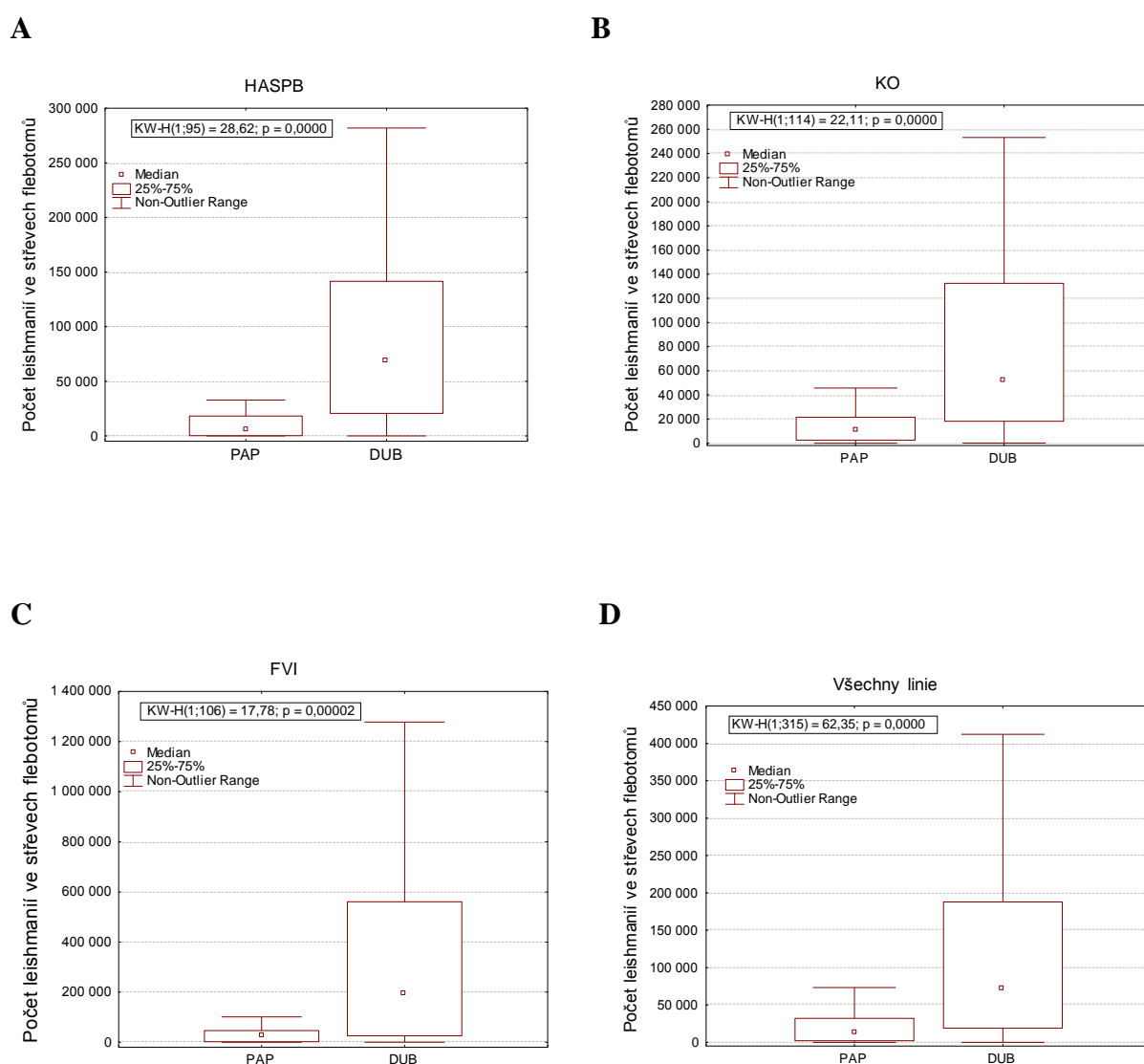
DPI	Linie <i>L. major</i>	Morfologická forma	N	Délka těla		Délka bičíku		Šířka těla	
				Průměr (S.O.)(μm)	Rozsah (μm)	Průměr (S.O.)(μm)	Rozsah (μm)	Průměr (S.O.)(μm)	Rozsah (μm)
11	FVI	Dlouhá nektomonáda	14	15,6 (1,4)	14,1-18,5	17,8 (6,7)	1,9-26,7	2,2 (0,5)	1,3-3,2
		Metacyklický promastigot	55	8,5 (1,9)	4,4-12,8	24,1 (6,2)	10,0-37,8	1,5 (0,6)	0,7-3,3
		Krátký promastigot	51	10,5 (2,2)	5,1-13,9	13,6 (5,0)	3,6-23,6	1,9 (0,6)	0,7-4,1
		Celkem	120	10,2 (2,9)	4,4-18,5	18,9 (7,6)	1,9-37,8	1,8 (0,4)	0,7-4,1
	HASPB	Dlouhá nektomonáda	65	17,1 (2,1)	14-22,3	19,8 (5,0)	5,8-28,0	2,0 (0,4)	1,4-3,9
		Metacyklický promastigot	3	7,1 (4,6)	2,4-11,5	22,4 (4,7)	17,0-25,3	9,2 (12,9)	1,6-24,1
		Krátký promastigot	52	11,3 (1,9)	6,6-13,9	11,6 (6,1)	3,3-26,3	2,1 (0,6)	1,4-3,6
		Celkem	120	14,3 (3,7)	2,4-22,3	16,3 (6,9)	3,3-28,0	2,2 (2,1)	1,4-24,1
	KO	Dlouhá nektomonáda	73	17,3 (2,7)	14,0-24,5	21,2 (3,8)	6,7-29,0	1,7 (0,4)	1,1-2,9
		Metacyklický promastigot	7	7,4 (2,9)	1,7-10,1	20,4 (4,1)	15,2-25,6	4,8 (7,1)	1,3-20,8
		Krátký promastigot	40	12,1 (1,3)	9,4-13,9	17,4 (2,3)	10,9-24,4	1,6 (0,4)	0,8-2,5
		Celkem	120	15,0 (3,8)	1,7-24,5	19,9 (3,8)	6,7-29,0	1,9 (1,8)	0,8-20,8

Tab. 10. Rozměry morfologických forem linií *L. major* FVI, HASPB a KO během vývoje v *P. duboscqi* 10. den po infekci. Infekční dávka 1×10^7 buněk/ml.

DPI	Linie <i>L. major</i>	Morfologická forma	N	Délka těla		Délka bičíku		Šířka těla	
				Průměr (S.O.)(μm)	Rozsah (μm)	Průměr (S.O.)(μm)	Rozsah (μm)	Průměr (S.O.)(μm)	Rozsah (μm)
10	FVI	Dlouhá nektomonáda	10	15,1 (0,7)	14,2-16,3	16,0 (3,1)	10,9-21,1	2,1 (0,7)	1,5-3,8
		Metacyklický promastigot	86	8,4 (1,9)	3,5-11,9	25,7 (4,8)	9-36,1	1,2 (0,4)	0,3-2,5
		Krátký promastigot	24	10,7 (2,2)	5,1-13,6	15,0 (3,9)	5,2-21,9	1,9 (0,7)	0,6-3,4
		Celkem	120	9,4 (2,7)	3,5-16,3	22,8 (6,5)	5,2-36,1	1,4 (0,6)	0,3-3,8
	HASPB	Dlouhá nektomonáda	50	16,9 (2,7)	14,0-28,2	19,7 (2,9)	13,2-25,7	1,8 (0,4)	0,9-2,8
		Metacyklický promastigot	4	8,9 (2,0)	7,3-11,6	20,6 (3,7)	16,7-24,2	1,8 (0,6)	1,3-2,3
		Krátký promastigot	66	11,7 (1,9)	4,4-13,9	16,8 (3,8)	4,6-23,8	1,6 (0,5)	0,5-2,9
		Celkem	120	13,8 (3,5)	4,4-28,2	18,1 (3,8)	4,6-25,7	1,7 (0,5)	0,5-2,9
	KO	Dlouhá nektomonáda	60	19,6 (5,5)	14-40,3	21,3 (4,4)	10,8-29,0	1,8 (0,4)	0,9-2,8
		Metacyklický promastigot	4	9,3 (1,9)	8-12,2	22,2 (3,7)	17,7-26,5	1,7 (0,7)	1,2-2,8
		Krátký promastigot	56	11,7 (2,0)	3,9-13,9	16,7 (4,7)	6,1-25,2	1,6 (0,6)	0,4-3,8
		Celkem	120	15,5 (5,8)	3,9-40,3	19,1 (5,0)	6,1-29,0	1,7 (0,5)	0,4-3,8

4.5 Srovnání intenzity infekce jednotlivými liniemi *L. major* mezi přenašeči *P. papatasi* a *P. duboscqi*

Výsledky prokázaly signifikantní rozdíl v intenzitě infekce jednotlivými liniemi *L. major* mezi infikovanými *P. papatasi* a *P. duboscqi*. Infekční dávka byla v těchto případech 1×10^6 buněk/ml krve. Ve všech případech byla intenzita infekce výrazně vyšší u *P. duboscqi*, a to jak v porovnání jednotlivých linií tak i všech linií společně. Výsledky jsou znázorněny na obrázku 22.

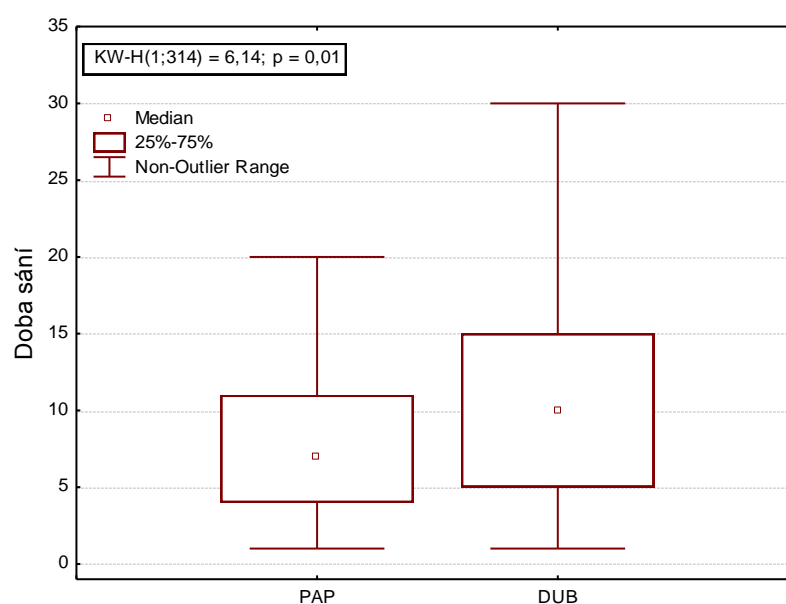


Obr. 22. Rozdíl v počtu leishmanií ve střevích *P. papatasi* / *P. duboscqi* nakažených jednotlivými liniemi *Leishmania major*, **A.** linie HASPB, **B.** linie KO, **C.** linie FVI, **D.** všechny linie. Zahrnuty všechny pokusy a dny po infekci.

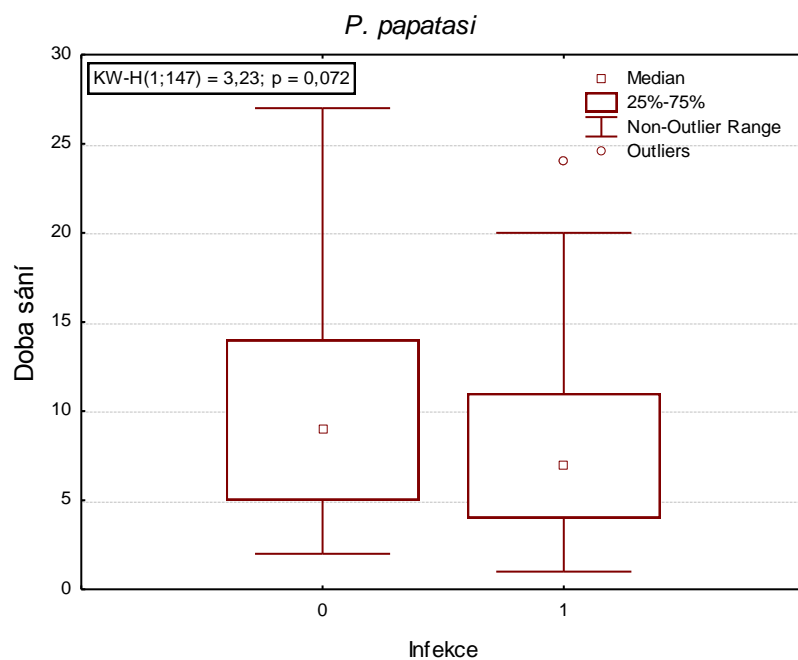
4.6 Srovnání doby sání mezi přenašeči *P. papatasi* a *P. duboscqi*

Při experimentech jsme zaznamenávali dobu sání jednotlivých flebotomů na myši. Doba sání byla srovnávána mezi infikovanými flebotomy obou druhů, mezi infikovanými a neinfikovanými flebotomy jednoho druhu, a mezi jednotlivými liniemi *L. major* u každého z druhů.

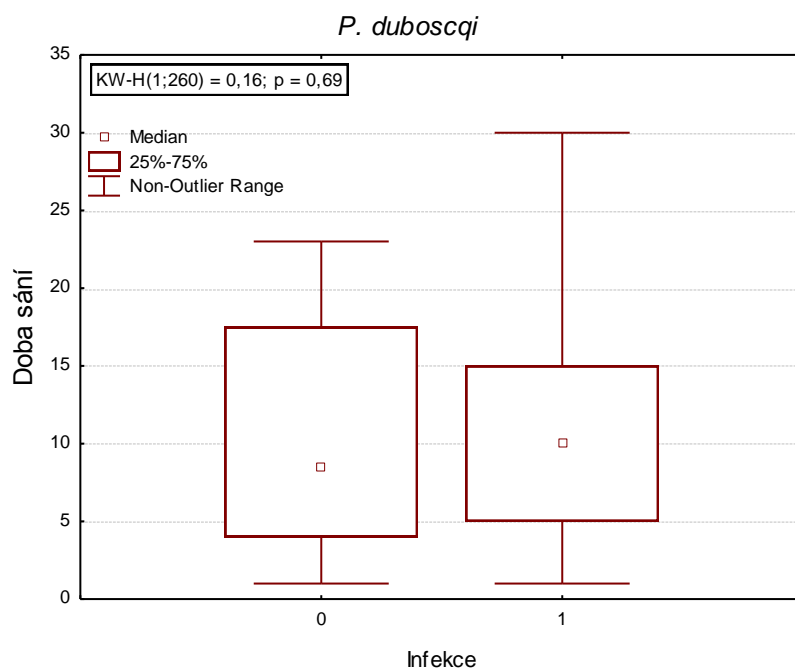
Doba sání infikovaných flebotomů, nehledě na linii *L. major* a den po infekci, je signifikantně delší u *P. duboscqi* (KW-H: $p = 0,01$). Rozdíly v době sání mezi infikovanými a neinfikovanými samicemi nebyly statisticky průkazné, a to jak u druhu *P. papatasi* (KW-H: $p = 0,072$) tak ani u *P. duboscqi* (KW-H: $p = 0,69$). Výsledky jsou znázorněny na obrázcích 23, 24 a 25. U infikovaných *P. papatasi* sáli nejdéle ti, co byli nakaženi *L. major* FVI (KW-HV (2;98) = 7,014; $p = 0,03$). Naopak u *P. duboscqi* byly rozdíly v době sání infikovaných flebotomů mezi liniemi *L. major* nesignifikantní (KW-HV (2;216) = 4,30359928; $p = 0,1163$).



Obr. 23. Doba sání u infikovaných *P. papatasi* a *P. duboscqi*.



Obr. 24. Doba sání u neinfikovaných (0) a infikovaných (1) *P. papatasi*.



Obr. 25. Doba sání u neinfikovaných (0) a infikovaných (1) *P. duboscqi*.

4.7 Průběh infekcí u myší nakažených mutantními liniemi *L. major*

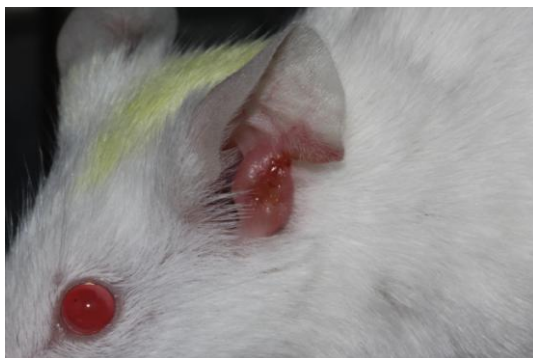
Během dlouhodobých pokusů jsme sledovali vznik lézí u myší infikovaných *L. major* FVI, HASPB nebo KO linií sáním infikovaných samic *P. papatasi* nebo *P. duboscqi*. Pokusy probíhaly po dobu 114 – 120 dnů. Na závěr pokusu byly odebrány vzorky tkání z místa sání na uších (případně nosu), dále pravá a levá spádová mízní uzlina, slezina a část jater.

U experimentů s *P. papatasi* bylo celkem sáto 11 myší. Ale ne všichni flebotomové byli infikováni, jak ukázala pozdější qPCR. Čtyři myši byly sáty samicemi *P. papatasi* infikovanými linií FVI a tři myši linií HASPB. Myši sáto skupinou KO chybí, protože flebotomové sající na myši nebyli linií KO nakaženi. U myší infikovaných sáním *P. papatasi* se žádná léze nevytvořila a výsledky qPCR z tělesných orgánů a místa sání na kůži myši byly negativní. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 6.

Tab. 6. Dlouhodobé sledování myší infikovaných liniemi *L. major* sáním samic *P. papatasi*.

Experiment	Linie <i>L. major</i>	Počet flebotomů		Léze
		Sátých na myši	Z nich infikováno	
1.	FVI	6	2	0
2.	HASPB	13	8	0
3.	FVI	4	4	0
	KO	2	0	0
Celkem	FVI	10	6	0
	HASPB	13	8	0
	KO	2	0	0

U experimentů s *P. duboscqi* bylo celkem sáto 21 myší. Osm myší bylo sáto skupinou infikovanou linií FVI. Šest myší bylo sáto skupinou s linií HASPB a sedm myší skupinou KO. U jedné myši se v 11. týdnu po bodnutí flebotoma vytvořila léze na uchu. Tato myš byla sáto flebotomem infikovaným *L. major* FVI, jehož intenzita infekce byla minimálně dvakrát větší (přibližně milion leishmanií) než u ostatních samic ze stejného experimentu (druhý) (Obr. 26). Kvantitativní PCR naměřila v postiženém uchu řádově miliony leishmanií. V levé mízní uzlině pod infekčním uchem byly zjištěny řádově tisíce leishmanií. Pravá uzlina, slezina a játra byly negativní. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 7.



Obr. 26. Myš nakažená *L. major* FVI sáním *P. papatasi*, 119 dní po sání flebotoma.

Tab. 7. Dlouhodobé sledování myši sátých samice *P. duboscqi* infikovanými různými liniemi *L. major*.

Experiment	Linie <i>L. major</i>	Počet flebotomů		Léze
		Sátých na myši	Z nich infikováno	
1.	FVI	8	6	0
	HASPB	4	4	0
	KO	5	4	0
2.	FVI	6	4	1
	HASPB	2	2	0
	KO	7	2	0
3.	FVI	10	9	0
	HASPB	7	7	0
	KO	7	6	0
Celkem	FVI	24	19	1
	HASPB	13	13	0
	KO	19	13	0

5 DISKUZE

První část diplomové práce byla věnována koinfekcím *L. major* a *L. turanica* v přenašeči, včetně jejich možného sexuálního rozmnožování. Tyto dva druhy leishmanií se vyskytují sympatricky v Centrální Asii, v rezervoárovém zvířeti *Rhombomys opimus* a přenašeči *Phlebotomus papatasi* (Strelkova a kol. 1990), přesto se nikdo dosud o hledání hybridů mezi výše zmíněnými druhy nepokoušel. Hybridní buňky leishmanií jsme se pokusili detekovat na základě fluorescence metodou FACS a konfokální mikroskopií, stejně jako v práci Sadlova a kol. (2011). Autoři touto metodou našli hybrida *L. donovani* Gebre-1 (RFP) / LEM 4265 (GFP) u *Lutzomyia longipalpis*, a to druhý den po infekci. Naším cílem bylo pomocí metody FACS selektovat případné hybridy a spočítat frekvenci genetické výměny.

Koinfekce *L. major* WHOM/IR/-/173 Ds RED (RFP⁺) a *L. turanica* MRHO/MN/08/BZ18 (GFP⁺) jsme nejdříve prováděli s jejich přirozeným přenašečem *P. papatasi*. Pouze z druhého dne po infekci byli vysortováni potencionální hybridi. Z 39 případů jsme ale pod konfokálním mikroskopem nepotvrdili žádnou buňku leishmanie se dvěma fluorescenčními signály. Po negativních výsledcích s *P. papatasi* jsme prováděli experimentální koinfekci s jeho blízkým příbuzným druhem *P. duboscqi*, který je také přirozeným přenašečem *L. major*. Ani zde jsme vysortované částice nepotvrdili jako hybridy. Z 310 vypitvaných samic *P. papatasi* a *P. duboscqi* nebyli 2., 9., ani 14. den po infekci nalezeny žádné hybridní leishmanie. Všechny vysortované objekty s červeným i zeleným fluorescenčním signálem se na konfokálním mikroskopu ukázaly jako žlutě svítící zbytky střev nebo jako žluté krystalky pravděpodobně původem z krve.

U *P. papatasi* bylo potvrzeno, že se *L. major* s *L. turanica* vyvíjí obdobně a výrazně si nekonkurují (Chajbullinova 2012, nepublikováno). Naproti tomu u *P. duboscqi* bylo opakovaně zaznamenáno více zeleně svítících buněk *L. turanica* než červených *L. major*, zejména v pozdních fázích infekce. *Leishmania turanica* se v *P. duboscqi* masivně pomnožila, zatím co počty *L. major* byly v obou přenašečích srovnatelné. Velké rozdíly mezi *L. turanica* a *L. major* byly zejména devátý (67 : 1) a čtrnáctý (118 : 1) den po infekci *P. duboscqi*. Zdali je důvodem jejich vzájemná konkurence, by musely potvrdit další studie zaměřené na infekce a koinfekce *P. duboscqi* těmito druhy leishmanií.

Skutečnost, že nebyla v této práci pozorovaná hybridizační událost, má několik možných vysvětlení. Obě kultury leishmanií byly po dlouhou dobu chovány v laboratorních podmínkách, čímž se mohla zhoršit schopnost jejich vývoje v přenašeči, podobně jako se jim s počtem pasáží snižuje virulence pro obratlovčího hostitele (Sadlova a kol. 1999). Navíc

flebotomové byli infikováni čtyři dny starou kulturou procyklických promastigotů, ne makrofágy s amastigoty, jakoby tomu bylo během přirozeného sání na obratlovci. Ovšem nutno připomenout, že za stejných podmínek se hybridy podařilo najít u dvou kmenů *L. major* (Akopyants a kol. 2009). Kromě výše zmíněných skutečností existuje také možnost, že mezi těmito druhy ke genetické výměně nedochází a nebo jen vzácně, jak naznačují dosavadní experimenty. Ty zjistily, že ke genetické výměně u *L. donovani* dochází s frekvencí $4,8 \times 10^{-5}$ (Sadlova a kol. 2011) a u *L. major* s frekvencí $2,5 \times 10^{-5}$ (Akopyants a kol. 2009). I tak je ale sexuální rozmnožování mezi rozdílnými druhy epidemiologicky významné, jak potvrzují i experimentální infekce hybridy *L. major* / *L. infantum* u *P. papatasi*. Tito hybridi exprimovali lipofosfoglykan stejného typu jako *L. major*, což jim zřejmě umožnilo přežít ve střevě *P. papatasi*, v němž jinak *L. infantum* není schopna vývoje (Volf a kol. 2007).

Druhá tématická část předkládané práce byla zaměřena na roli genů specifických pro metacyklická stadia *Leishmania major*. K tomu, aby byly leishmanie schopné infikovat obratlovčího hostitele, musí projít tzv. metacyklogenezí, jejímž výsledkem je vznik vysoce pohyblivých metacyklických promastigotů. U těchto infekčních stádií *L. major* jsou exprimovány specifické geny ležící na lokusu LmcDNA16 chromozomu 23. Jedná se o skupinu genů HASP (hydrophilic acylated surface protein) a SHERP (small hydrophilic ER-associated protein) (McKean a kol. 2001). Nedávné výsledky z experimentálních infekcí *P. papatasi* demonstrují nepostradatelnou úlohu HASP a SHERP proteinů při metacyklogenezi leishmanií v přenašeči (Sadlova a kol. 2010). Linie *L. major* KO postrádající obě skupiny genů netvořila metacyklické promastigoty a nekolonizovala stomodeální valvu, autoři předvídají její obtížný přenos vektorem (Sadlova a kol. 2010). Proto nás zajímalo, zdali bude *L. major* postrádající geny HASP a SHERP schopná přenosu na savčího hostitele sáním infikovaného vektora. Pro experimenty jsme měli k dispozici mutantní linii *L. major* Friedlin KO (bez LmcDNA16 lokusu) a HASPB (KO s vráceným genem HASPB do původního místa v chromozomu) a dvě kolonie přirozených přenašečů *L. major*: *P. papatasi* a *P. duboscqi*.

Z 84 infikovaných samic *P. papatasi* nasátých na myši se podařilo pouze ve čtyřech případech přenést leishmanie do myší kůže. Celkem zaznamenala nejvyšší procento úspěšnosti přenosu kontrolní linie (wild type) *L. major* FVI (7%). Linie HASPB, u níž byl gen vrácen do episomu buňky, je v práci Sadlova a kol. (2010) popsána jako částečně obnovující původní fenotyp (kolonizace stomodeální valvy obdobná jako linie FVI). V naší práci jsme používali jinou linii HASPB, u níž byl gen vrácen do původního místa v chromozomu. Přenos této linie se podařil s menší úspěšností než u linie FVI (4%). Nejhůře se přenášela mutantní

linie KO, která zaznamenala úspěšnost přenosu ve 3%. Z těchto výsledků se zdá, že *L. major* postrádající HASP a SHERP geny se přenáší sáním vektora *P. papatasi* hůře než linie FVI, ale že přenos linie KO (selhávající v tvorbě metacyklů dle Sadlova a kol. 2010) v některých případech možný je. Rozdíly mezi liniemi ale nejsou tak výrazné, jak bychom dle dosavadních poznatků očekávali. Zejména u linie FVI bychom předpokládali více přenosů a více přenesených leishmanií. Příčinou mohly být opakované potíže s intenzitou infekce po experimentálních infekcích *P. papatasi*, přestože samice sály na krmítku velmi dobře. V období experimentů se kolonie *P. papatasi* nacházela v horším stavu, což mohlo negativně ovlivnit úspěšnost přenosu.

Dále jsme ty samé mutantní linie *L. major* přenášeli sáním *P. duboscqi*. Ze 168 infikovaných samic *P. duboscqi* se podařilo 15 přenosů (infekční dávka 1×10^6 buněk/ml). Podobně jako u *P. papatasi* byly přenosy nejúspěšnější u linie FVI, která se přenesla ve 20%. *Leishmania major* KO byla přenášena v menší míře (7%) než kontrolní linie. Naopak ani v jediném ze tří pokusů s *P. duboscqi* se nepřenesla *L. major* HASPB. Podobnou úspěšnost přenosu *L. major* FVI popisují v práci Kimblin a kol. (2008). Autoři zaznamenali přenos *L. major* FVI sáním infekčních *P. duboscqi* v 19%.

Velký rozdíl byl nalezen v počtu přenesených leishmanií. Samice *P. duboscqi* nakažené linií KO inokulovaly do myší kůže 5 – 51 leishmanií, zatímco při infekci linií FVI byla samicemi inokulovaná dávka 15 – 8600 leishmanií. Výsledné přenosy podobně jako u *P. papatasi* ukazují, že *L. major* postrádající geny HASP a SHERP jsou přenášeny v menší míře než kontrolní linie FVI. Také množství přenesených leishmanií linie KO sáním *P. duboscqi* je výrazně menší než u kontrolní linie, pouze pár desítek buněk. Možným důvodem neúspěšného přenosu HASPB linie se zabývám dále.

V souvislosti s přenosy nás zajímal poměr morfologických stádií mezi jednotlivými liniemi *L. major*, a zdali procento úspěšných přenosů závisí na počtu metacyklických promastigotů, jak dokazují v práci Stamper a kol. (2011). U linie FVI metacyklických promastigotů tvořili 10. den po infekci 46% morfologických stádií a 42% bylo krátkých promastigotů. Naproti tomu u linií HASPB a KO byly poměry mezi morfologickými stádii výrazně jiné a metacyklických promastigotů tvořili jen zlomek jejich morfologických forem. U linie HASPB se metacyklických promastigotů vyskytovali pouze ve 2% a u KO linie v 5%. Největší zastoupení měly u obou mutantních linií dlouhé nektomonády (55% a 62%). U naší linie HASPB byly tedy nalezeny jiné poměry morfologických stádií než v práci Sadlova a kol. (2010). Autoři popisují, že linie HASPB s episomálně vloženým genem HASPB tvořila, stejně jako kontrolní linie FVI, více krátkých a metacyklických promastigotů než další tři

testované linie (KO, Kin, +SHERP). Skutečnost, že naše linie HASPB (s genem HASPB vloženým zpět do chromozomu) tvořila velmi málo metacyklů v porovnání s kontrolní linií, znamená, že důležitou roli při metacyklogenezi mají pravděpodobně i SHERP geny.

Abychom otestovali korelaci počtu přenosů s množstvím metacyklů, zvýšili jsme ve čtvrtém pokusu experimentálních přenosů sáním *P. duboscqi* infekční dávku na 1×10^7 buněk/ml. Procento metacyklických promastigotů bylo u FVI signifikantně vyšší (72%) a úspěšnost přenosu FVI se zvýšila z 20% na 24%. Počet leishmanií inokulovaných do myši se ale nezvýšil. Z těchto výsledků se zdá, že větší podíl metacyklů může korelovat s častějšími přenosy. Zvýšení četnosti přenosu bohužel nebylo statisticky průkazné kvůli malému N úspěšných přenosů. Zastoupení jednotlivých morfologických stádií mutantních linií nebylo u vyšší infekční dávky signifikantně rozdílné. S tím pravděpodobně souvisí i podobná četnost přenosů mutantních linií. Úspěšnost přenosu linie KO se zvýšila pouze ze 7% na 8% a linie HASPB se opět nepřenesla.

Výsledky přenosů by také mohla objasnit kolonizace stomodeální valvy u *P. duboscqi*, kterou jsme zaznamenali při přípravě roztěrů pro barvení. Linie FVI ve všech případech (20 roztěrů) silně kolonizovala stomodeální valvu. Linie HASPB kolonizovala stomodeální valvu ve třetině případů, avšak jen slabě, a linie KO stomodeální valvu nekolonizovala. Obtížná kolonizace stomodeální valvy a malé procento metacyklů u linie HASPB by mohlo vysvětlovat, proč se tato linie nepřenašela. Podobný vývoj v přenašeči zaznamenala však i linie KO, která se v některých případech přenesla. Možné příčiny přenosu vysvětlují dále.

V souhrnu se použité linie *L. major* chovaly v *P. duboscqi* takto: FVI linie tvořila velké množství metacyklů, kolonizovala stomodeální valvu a byla přenesena sáním *P. duboscqi* ve 20 - 24%. Linie HASPB tvořila 2 – 3% metacyklů, zřídka a jen slabě kolonizovala stomodeální valvu a nebyla přenášena sáním *P. duboscqi*. Linie KO tvořila 3 – 5% metacyklů, neosídlovala stomodeální valvu a přenášela se pouze v 7 – 8%, tedy pouze ve třetině případů v porovnání s kontrolní linií FVI.

Výsledné přenosy mutantních linií vedou k diskuzi o možném mechanismu přenosu leishmanií. Nejpravděpodobnější a dnes nejvíce uznávaný způsob přenosu je regurgitace leishmanií při sání flebotoma, k čemuž napomáhá blokáce stomodeální valvy promastigotním sekretorickým gelem (PSG) produkovaným leptomonádami a blokáce haptomonádami, které kolonizují stomodeální valvu (Rogers a kol. 2004, Bates 2007). K regurgitaci také napomáhá narušení funkce stomodeální valvy chitinázami produkovanými leishmaniami (Schlein a kol. 1992, Volf a kol. 2004). V našem případě u *L. major* FVI je tento mechanismus pravděpodobný, vzhledem k silné infekci a silné kolonizaci stomodeální valvy. Mutantní linie

KO se však u obou druhů vektorů přenesla také, ačkoli ani u *P. papatasi* (Sadlova a kol. 2010) ani u *P. duboscqi* nekolonizuje stomodeální valvu. Je možné, že k rozrušení valvy není třeba zničení kutikulární výsledky stomodeální valvy haptomonádami a k přenosu postačuje blokáce thorakální části mesenteronu masou promastigotů.

Dále nás zajímalo, jakou roli hrála při přenosech intenzita infekce. Při experimentech s oběma přenašeči se výrazně lépe přenášela kontrolní linie FVI, která se také (v porovnání s mutanty) nejvíce v obou druzích flebotomů množila. Intenzita infekce mutantních linií byla signifikantně rozdílná pouze u *P. papatasi*, ve kterém se linie KO namnožila lépe než linie HASPB. Intenzita infekce FVI byla největší v našem druhém pokusu s *P. duboscqi*, ze kterého pochází všech 10 úspěšných přenosů *L. major* FVI (55,5% přenášejících samic ve druhém pokusu).

Většina přenášejících samic *P. duboscqi* inokulovala do kůže méně než 1000 promastigotů *L. major* FVI. Intenzita infekce ve střevě samic flebotomů však nekorelovala s množstvím přenesených parazitů. Ke stejnému závěru dospěli v práci Kimblin a kol. (2008), u *P. duboscqi*, kteří během sání přenášeli pod 1000 promastigotů *L. major* (většina), nebyla závislost inokulované dávky na intenzitě infekce ve střevě průkazná. Intenzita infekce korelovala s inokulovanou dávkou pouze u flebotomů přenášejících více jak 1000 promastigotů (Kimblin a kol. 2008). Domníváme se proto, že se při větším množství leishmanií ve střevě flebotoma zvyšuje pravděpodobnost přenosu, ale nemusí se tím zvyšovat množství přenesených leishmanií.

V práci jsme také sledovali dobu sání u obou druhů flebotomů. Doba sání mezi neinfikovanými samice *P. duboscqi* a *P. papatasi* se signifikantně nelišila (infekční dávka 1×10^6 buněk/ml). Oproti tomu infikované samice *P. duboscqi* sály déle než infikované samice *P. papatasi*. Příčinou by mohla být výrazně vyšší intenzita infekce u *P. duboscqi*. Ani u jednoho druhu jsme však neprokázali signifikantní rozdíl mezi dobou sání infikovaných a neinfikovaných. V práci Maia a kol. (2011) autoři sledovali dobu sání na modelu *Leishmania infantum* - *Lutzomyia longipalpis* / *Phlebotomus perniciosus* (infekční dávka 1×10^7 buněk/ml). V tomto případě sály déle samice infikované než neinfikované. Déle sály také samice, které zaznamenaly úspěšný přenos než infikované samice bez přenosu leishmanií (Maia a kol. 2011). Tato recentní práce podporuje hypotézu o manipulaci sání flebotomů leishmaniemi, kterou navrhuje autoři Rogers a Bates (2007). U samic *Lutzomyia longipalpis* infikovaných *L. infantum* / *L. mexicana* doba sání korelovala s množstvím metacyklů a produkcí promastigotního sekretorického gelu, který produkují nektomonády (Rogers a Bates 2007).

Příčinou našich rozdílných výsledků může být především použití jiné kombinace parazit-vektor a také nižší použitá infekční dávka.

V neposlední řadě jsme v práci sledovali také průběh infekcí u myší nakažených *L. major* sáním *P. papatasi* a *P. duboscqi*. Z celkového počtu 28 myší, na kterých sály infikované samice, se léze objevila u jediné myši. Tato myš byla sáta *P. duboscqi* nakaženým *L. major* FVI. Žádná další léze ani přítomnost leishmanií v kůži či orgánech nebyla pomocí qPCR zjištěna. Flebotomové tak do ostatních sledovaných myší pravděpodobně neinokulovali žádné leishmanie nebo nízký počet inokulovaných leishmanií nebyl dostatečný k uchycení infekce u myši. Vznik kožní léze mimo jiné předurčuje infekční dávka, jak dokazuje Kimblin a kol. (2008) při srovnání infekcí s nízkou (100) a vysokou (5000) dávkou metacyklických promastigotů *L. major* inokulovaných jehlou do myši kůže. Nízká infekční dávka způsobovala jen mírnou infekci, za to ale vyšší množství parazitů v kůži během chronické fáze, čímž se hostitelé stávají rezervoáry nákazy. Vysoká dávka způsobila brzy velké léze, ale posléze došlo k vyhojení (Kimblin a kol. 2008).

Samice *P. duboscqi* nakažená linií FVI, která jako jediná způsobila lézi u myši, pocházela z druhého dlouhodobého pokusu. Intenzita infekce této samice byla v porovnání s ostatními samicemi ze stejného pokusu minimálně dvakrát vyšší (10^6 leishmanií). Tento výsledek opět podporuje naši domněnku, že čím vyšší je intenzita infekce, tím vyšší je i pravděpodobnost úspěšného přenosu sáním infikovaného flebotoma.

Od přirozených podmínek se naše experimenty lišily v nákaze flebotomů promastigoty leishmanií namísto makrofágů s amastigoty, jak by tomu bylo během přirozeného sání na obratlovci. Obě kolonie přenašečů jsou chovány několik let v laboratorních podmínkách, což mohlo také negativně ovlivnit přenos *L. major*. Přenos leishmanií sáním flebotomů může být ovlivněn také teplotou a přítomností vajíček v čase expozice hostiteli. Benkova a Volf (2007) zjistili, že kladení vajec bylo opožděno a trvalo delší dobu u samic chovaných ve 23 °C, ve srovnání se samicemi chovanými ve 28 °C. Je též známo, že podruhé sají krev agresivněji ty samice, které byly při experimentech vykladené (Stamper a kol. 2011). Samičím *P. duboscqi* během našich experimentů kladení vajíček dlouho trvalo. Některé samice se vůbec nevykladly a pravděpodobně kvůli tomu nebyly příliš aktivní při druhém sání. Přítomnost vajíček u některých samic tak mohla negativně ovlivnit přenos.

Lze shrnout, že procento úspěšných přenosů závisí na druhové kombinaci parazit-vektor, intenzitě infekce přenašeče, procentu metacyklických stádií, přítomnosti či nepřítomnosti vajíček, aktuálním stavu kolonie flebotomů a některých fyzikálních faktorech, které ovlivňují samice flebotomů (teplota, vlhkost vzduchu, atmosferický tlak). Z těchto

důvodů jsou experimentální přenosy sáním flebotomů velmi časově náročné a přes velké N použitých samic flebotomů či myší není úspěch zaručen. Přesto jsme v této práci demonstrovali, že zásah do lokusu LmcDNA16 *L. major*, ať už v podobě linie HASPB nebo KO, znamená narušení přirozeného vývoje *L. major* v přirozených přenašečích *P. papatasi* a *P. duboscqi* a snížení pravděpodobnosti jejího přenosu experimentálním sáním na myších.

6 ZÁVĚREČNÉ SHRnutí

- Koinfekce fluorescenčně značenými leishmaniami prokázaly, že ve *Phlebotomus papatasi* se *Leishmania major* a *L. turanica* vyvíjejí obdobně a bez výrazného rozdílu v intenzitě infekce. Naproti tomu v *P. duboscqi* se při společném vývoji výrazně lépe množila *L. turanica*.
- Užitím fluorescenčně značených promastigotů *L. major* a *L. turanica* jsme pomocí metody FACS a konfokální mikroskopie nezaznamenali mezi těmito druhy hybridní událost v žádné ze studovaných fází infekce ve střevě *P. papatasi* a *P. duboscqi*.
- Linie *L. major* mutantní v lokusu LmcDNA16 (HASPB a KO) se ve *P. papatasi* i *duboscqi* množily signifikantně méně než kontrolní linie FVI. U *P. papatasi* se navíc linie KO množila lépe než HASPB. Naproti tomu množství leishmanií HASPB a KO vyvíjejících se ve *P. duboscqi* nebylo statisticky rozdílné.
- Při experimentálních infekcích *P. papatasi* nebyl mezi mutantními liniemi a kontrolní linií výrazný rozdíl ani v procentuální úspěšnosti přenosu, a ani v počtu inokulovaných leishmanií do myši.
- Ve *P. duboscqi* byla linie KO schopná přenosu sáním pouze v malém procentu případů a inokulovaných leishmanií bylo také méně, než u kontrolní linie FVI. Linie HASPB se u *P. duboscqi* nepřenášela.
- Potvrdili jsme, že genový lokus kódující HASPB a SHERP proteiny hraje nepostradatelnou roli při metacyklogenezi. Mutantní linie HASPB a KO tvořily velmi málo metacyklických promastigotů a ani po zvýšení infekční dávky se procento metacyklů signifikantně nezvýšilo.
- U kontrolní FVI linie četnost úspěšných přenosů nezávisela na počtu metacyklů.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Akhavan, A. A., M. R. Yaghoobi-Ershadi, H. Mirhendi, M. H. Alimohammadian, Y. Rassi, N. Shareghi, R. Jafari, M. H. Arandian, H. Abdoli, M. Ghanei, N. Jalali-Zand & A. Khamesipour (2010). Molecular epizootiology of rodent leishmaniasis in a hyperendemic area of Iran. *Iranian Journal of Public Health*, 39, 1-7.
- Akopyants, N. S., N. Kimblin, N. Secundino, R. Patrick, N. Peters, P. Lawyer, D. E. Dobson, S. M. Beverley & D. L. Sacks (2009). Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector. *Science*, 324, 265-268.
- Ayala, F. J. 1998. Is sex better? Parasites say "no". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 3346-3348.
- Bates, P. A. (2007). Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*, 37, 1097-1106.
- Bates, P. A. & M. E. Rogers (2004). New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. *Current Molecular Medicine*, 4, 601-609.
- Belhadj, S., F. Pratlong, N. H. Toumi, K. Kallel, H. Mahjoub, H. Babba, R. Azaiez, J. P. Dedet & E. Chaker (2002). Visceral leishmaniasis in Tunisia: result of the isoenzymatic characterization of 65 *Leishmania infantum* strains. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 96, 627-630.
- Belli, A. A., M. A. Miles & J. M. Kelly (1994). A putative *Leishmania-panamensis* *Leishmania-braziliensis* hybrid is a causative agent of human cutaneous leishmaniasis in Nicaragua. *Parasitology*, 109, 435-442.
- Benkova, I. & P. Volf (2007). Effect of temperature on metabolism of *Phlebotomus papatasi* (Diptera : Psychodidae). *Journal of Medical Entomology*, 44, 150-154.
- Chajbullinova, A. (2012). Nepublikováno
- Chargui, N., A. Amro, N. Haouas, G. Schonian, H. Babba, S. Schmidt, C. Ravel, M. Lefebvre, P. Bastien, E. Chaker, K. Aoun, M. Zribi & K. Kuhls (2009). Population structure of Tunisian *Leishmania infantum* and evidence for the existence of hybrids and gene flow between genetically different populations. *International Journal for Parasitology*, 39, 801-811.
- Cihakova, J. & P. Volf (1997). Development of different *Leishmania major* strains in the vector sandflies *Phlebotomus papatasi* and *P-duboscqi*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 91, 267-279.

- Cunningham, M. L., R. G. Titus, S. J. Turco & S. M. Beverley (2001).** Regulation of differentiation to the infective stage of the protozoan parasite *Leishmania major* by tetrahydrobiopterin. *Science*, 292, 285-287.
- Davies, C. R., A. M. Cooper, C. Peacock, R. P. Lane & J. M. Blackwell (1990).** Expression of lpg and gp63 by different developmental stages of *Leishmania-major* in the sandfly *Phlebotomus-papatasi*. *Parasitology*, 101, 337-&.
- Delgado, O., E. Cupolillo, R. BonfanteGarrido, S. Silva, E. Belfort, G. Grimaldi & H. Momen (1997).** Cutaneous leishmaniasis in Venezuela caused by infection with a new hybrid between *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis*. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 92, 581-582.
- Dujardin, J. C., A. L. Banuls, A. Llanoscuertas, E. Alvarez, S. Dedoncker, D. Jacquet, D. Leray, J. Arevalo & M. Tibayrenc (1995).** Putative leishmania hybrids in the Eastern Andean valley of Huanuco, Peru. *Acta Tropica*, 59, 293-307.
- Evans, D., W. Kennedy, S. Elbihari, C. Chapman, V. Smith & W. Peters (1987).** Hybrid formation within the genus *Leishmania*? *Parassitologia*, 29, 165-73.
- Goddard, M., H. Godfray & A. Burt (2005).** Sex increases the efficacy of natural selection in experimental yeast populations. *Nature*, 636-640.
- Gramiccia, M. & L. Gradoni (2005).** The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. *International Journal for Parasitology*, 35, 1169-1180.
- Guan, L. R., Y. Q. Yang, J. Q. Qu & W. X. Shen (1995).** Discovery and study of *Leishmania turanica* for the first time in China. *Bulletin of the World Health Organization*, 73, 667-672.
- Heitman, J. 2006.** Sexual reproduction and the evolution of microbial pathogens. *Current Biology* 16: R711-R725.
- Jenni, L., S. Marti, J. Schweizer, B. Betschart, R. W. F. Lepage, J. M. Wells, A. Tait, P. Paindavoine, E. Pays & M. Steinert (1986).** Hybrid formation between african trypanosomes during cyclical transmission. *Nature*, 322, 173-175.
- Joshi, P. B., B. L. Kelly, S. Kamhawi, D. L. Sacks & W. R. McMaster (2002).** Targeted gene deletion in *Leishmania major* identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 120, 33-40.
- Kallinikova, V. D., R. M. Nasyrova, F. S. Nasyrov & V. M. Safjanova (1992).** Morphogenesis and virulence of *Leishmania-major* in the process of long-term cultivation. *Archiv Fur Protistenkunde*, 141, 327-334.
- Kamhawi, S. (2006).** Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends in Parasitology*, 22, 439-445.

- Kamhawi, S., M. Ramalho-Ortigao, V. M. Pham, S. Kumar, P. G. Lawyer, S. J. Turco, C. Barillas-Mury, D. L. Sacks & J. G. Valenzuela (2004).** A role for insect galectins in parasite survival. *Cell*, 119, 329-341.
- Kelly, J. M., J. M. Law, C. J. Chapman, G. Vaney & D. A. Evans (1991).** Evidence of genetic-recombination in *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 46, 253-263.
- Killick-Kendrick, R. (1979).** Biology of *Leishmania* in phlebotomine sandflies. In: *Biology of Kinetoplastida*, vol II. Academic Press, London/New York, p. 395–460.
- Killick-Kendrick R. (1990).** Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: A review. *Med Vet Ent*; 4:1–24.
- Killick-Kendrick, R. (1999).** The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clinics in Dermatology*, 17, 279-289.
- Kimblin, N., N. Peters, A. Debrabant, N. Secundino, J. Egen, P. Lawyer, M. P. Fay, S. Kamhawi & D. Sacks (2008).** Quantification of the infectious dose of *Leishmania major* transmitted to the skin by single sand flies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 10125-10130.
- Knuepfer, E., Y. D. Stierhof, P. G. McKean & D. F. Smith (2001).** Characterization of a differentially expressed protein that shows an unusual localization to intracellular membranes in *Leishmania major*. *Biochemical Journal*, 356, 335-344.
- Kumar, P., S. Sundar & N. Singh (2007).** Degradation of pteridine reductase 1 (PTR1) enzyme during growth phase in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Experimental Parasitology*, 116, 182-189.
- Lainson, R. and Shaw, J. J. (1987).** Evolution, classification and geographical distribution. In: *The leishmaniasis in Biology and Medicine*, ed: Peters, W. and Killick-Kendrick, R., Academic Press, p. 1–120.
- Lehane, M. J. (1997).** Peritrophic matrix structure and function. *Annual Review of Entomology*, 42, 525-550.
- Lewis, D. J., 1982.** A taxonomic review of genus *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae). *Bull. Brit. Mus. Nat. Hist. (Entomol. Ser.)* 45, 121-209.
- MacLeod, A., A. Tweedie, S. McLellan, M. Hope, S. Taylor, A. Cooper, L. Sweeney, C. M. R. Turner & A. Tait (2005).** Allelic segregation and independent assortment in *T. brucei* crosses: Proof that the genetic system is Mendelian and involves meiosis (vol 143, pg 12, 2005). *Molecular and Biochemical Parasitology*, 144, 131-131.

- Maia, C., V. Seblova, J. Sadlova, J. Votypka & P. Volf (2011).** Experimental Transmission of *Leishmania infantum* by Two Major Vectors: A Comparison between a Viscerotropic and a Dermotropic Strain. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 5.
- McConville, M. J., S. J. Turco, M. A. J. Ferguson & D. L. Sacks (1992).** Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania-major* promastigotes to an infectious stage. *Embo Journal*, 11, 3593-3600.
- McKean, P. G., R. Delahay, P. F. P. Pimenta & D. F. Smith (1997a).** Characterisation of a second protein encoded by the differentially regulated LmcDNA16 gene family of *Leishmania major*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 85, 221-231.
- McKean, P. G., P. W. Denny, E. Knuepfer, J. K. Keen & D. F. Smith (2001).** Phenotypic changes associated with deletion and overexpression of a stage-regulated gene family in *Leishmania*. *Cellular Microbiology*, 3, 511-523.
- McKean, P. G., K. R. Trenholme, D. Rangarajan, J. K. Keen & D. F. Smith (1997b).** Diversity in repeat-containing surface proteins of *Leishmania major*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 86, 225-235.
- Miles, M. A., M. Yeo & I. L. Mauricio (2009).** *Leishmania* Exploit Sex. *Science*, 324, 187-+.
- Mirzaei, A., S. Rouhani, H. Taherkhani, M. Farahmand, B. Kazemi, M. Hedayati, A. Baghaei, B. Davari & P. Parvizi (2011).** Isolation and detection of *Leishmania* species among naturally infected *Rhombomys opimus*, a reservoir host of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Turkmen Sahara, North East of Iran. *Experimental Parasitology*, 129, 375-380.
- Mukhopadhyay, J. & K. Ghosh (1999).** Vector potential of *Phlebotomus duboscqi* and *P. papatasi*: a comparison of feeding behaviour, reproductive capacity and experimental infection with *Leishmania major*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 93, 309-318.
- Musser, G. G. and Carleton, M. D. (2005).** Mammal Species of the World, A Taxonomic and Geographic Reference, ed: Wilson, D. E. et Reeder, D. M., The Johns Hopkins University Press, Baltimore, p. 1241–1242.
- Nolder, D., N. Roncal, C. R. Davies, A. Llanos-Cuentas & M. A. Miles (2007).** Multiple hybrid genotypes of *Leishmania* (*Viannia*) in a focus of mucocutaneous leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 76, 573-578.
- Parvizi, P. & P. D. Ready (2008).** Nested PCRs and sequencing of nuclear ITS-rDNA fragments detect three *Leishmania* species of gerbils in sandflies from Iranian foci of zoonotic cutaneous leishmaniasis. *Tropical Medicine & International Health*, 13, 1159-1171.

- Pimenta, P. F. P., S. J. Turco, M. J. McConville, P. G. Lawyer, P. V. Perkins & D. L. Sacks (1992).** Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. *Science*, 256, 1812-1815.
- Rassi, Y., M. A. Oshaghi, S. M. Azani, M. R. Abaie, S. Rafizadeh, M. Mohebai, F. Mohtarami & M. K. Zeinali (2011).** Molecular detection of *Leishmania* infection due to *Leishmania major* and *Leishmania turanica* in the vectors and reservoir host in Iran. *Vector-borne and zoonotic diseases*, 11, 145-150.
- Ravel, C., S. Cortes, F. Pratlong, F. Morio, J. P. Dedet & L. Campino (2006).** First report of genetic hybrids between two very divergent *Leishmania* species: *Leishmania infantum* and *Leishmania major*. *International Journal for Parasitology*, 36, 1383-1388.
- Rogers, M. E. & P. A. Bates (2007).** *Leishmania* manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. *Plos Pathogens*, 3, 818-825.
- Rogers, M. E., M. L. Chance & P. A. Bates (2002).** The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology*, 124, 495-507.
- Rogers, M. E., T. Ilg, A. V. Nikolaev, M. A. J. Ferguson & P. A. Bates (2004).** Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature*, 430, 463-467.
- Rougeron, V., T. De Meeus, M. Hide, E. Waleckx, H. Bermudez, J. Arevalo, A. Llanos-Cuentas, J. C. Dujardin, S. De Doncker, D. Le Ray, F. J. Ayala & A. L. Banuls (2009).** Extreme inbreeding in *Leishmania braziliensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 10224-10229.
- Rougeron, V., T. De Meeus, M. Hide, E. Waleckx, J. Dereure, J. Arevalo, A. Llanos-Cuentas & A. L. Banuls (2010).** A battery of 12 microsatellite markers for genetic analysis of the *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* complex. *Parasitology*, 137, 1879-1884.
- Sacks, D. L. (1989).** Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. *Experimental Parasitology*, 69, 100-103.
- Sadlova, J. (1999).** The life history of *Leishmania* (*Kinetoplastida: Trypanosomatidae*). *Acta Societatis Zoologicae Bohemicae*, 63: 331-366.
- Sadlova, J., H. P. Price, B. A. Smith, J. Votypka, P. Volf & D. F. Smith (2010).** The stage-regulated HASPB and SHERP proteins are essential for differentiation of the protozoan parasite *Leishmania major* in its sand fly vector, *Phlebotomus papatasi*. *Cellular Microbiology*, 12, 1765-1779.

- Sadlova, J., M. Svobodova & P. Volf (1999).** *Leishmania major*: effect of repeated passages through sandfly vectors or murine hosts. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 93, 599-611.
- Sadlova, J., M. Yeo, V. Šeblová, M. D. Lewis, I. Mauricio, P. Volf & M. A. Miles (2011).** Visualisation of *Leishmania donovani* fluorescent hybrids during early stage development in the sand fly vector. *Plos One*, 6.
- Schlein, Y., R. L. Jacobson & G. Messer (1992).** *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by bite. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 9944-9948.
- Seridi, N., A. Amro, K. Kuhls, M. Belkaid, C. Zidane, A. Al-Jawabreh & G. Schonian (2008).** Genetic polymorphism of Algerian *Leishmania infantum* strains revealed by multilocus microsatellite analysis. *Microbes and Infection*, 10, 1309-1315.
- Stamper, L. W., R. L. Patrick, M. P. Fay, P. G. Lawyer, D. E. A. Elnaiem, N. Secundino, A. Debrabant, D. L. Sacks & N. C. Peters (2011).** Infection parameters in the sand fly vector that predict transmission of *Leishmania major*. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 5.
- Stierhof, Y. D., P. A. Bates, R. L. Jacobson, M. E. Rogers, Y. Schlein, E. Handman & T. Ilg (1999).** Filamentous proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* promastigotes forms gel-like three-dimensional networks that obstruct the digestive tract of infected sandfly vectors. *European Journal of Cell Biology*, 78, 675-689.
- Strelkova, M. V. (1996).** Progress in studies on Central Asian foci of zoonotic cutaneous leishmaniasis: A review. *Folia Parasitologica*, 43, 1-6.
- Strelkova, M. V., L. N. Eliseev, E. N. Ponirovsky, T. I. Dergacheva, D. K. Annacharyeva, P. I. Erokhin & D. A. Evans (2001).** Mixed *Leishmania* infections in *Rhombomys opimus*: a key to the persistence of *Leishmania major* from one transmission season to the next. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 95, 811-819.
- Strelkova, M. V., A. V. Shurkhal, O. I. Kellina, L. N. Eliseev, D. A. Evans, W. Peters, C. J. Chapman, S. M. Leblancq & G. Vaneys (1990).** A new species of *Leishmania* isolated from the great gerbil *Rhombomys-opimus*. *Parasitology*, 101, 327-335.
- Tibayrenc, M. & F. J. Ayala (2002).** The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. *Trends in Parasitology*, 18, 405-410.
- Tibayrenc, M., F. Kjellberg & F. Ayala (1990).** A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 2414-8.

- Tibayrenc, M., F. Kjellberg & F. J. Ayala (1991).** The clonal theory of parasitic protozoa - a taxonomic proposal applicable to other clonal organisms. *Bioscience*, 41, 767-774.
- Turco, S. J. & A. Descoteaux (1992).** The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annual Review of Microbiology*, 46, 65-94.
- Victoir, K. & J. C. Dujardin (2002).** How to succeed in parasitic life without sex? Asking *Leishmania*. *Trends in Parasitology*, 18, 81-+.
- Volf, P., I. Benkova, J. Myskova, J. Sadlova, L. Campino & C. Ravel (2007).** Increased transmission potential of *Leishmania major* / *Leishmania infantum* hybrids. *International Journal for Parasitology*, 37, 589-593.
- Volf, P., M. Hajmova, J. Sadlova & J. Votypka (2004).** Blocked stomodeal valve of the insect vector: similar mechanism of transmission in two trypanosomatid models. *International Journal for Parasitology*, 34, 1221-1227.
- WHO - Control of the leishmaniasis (2010).** Report of a meeting of the WHO expert committee on the control of leishmaniasis, Geneva, 22–26 March.
- Walters, L. L., G. B. Modi, R. B. Tesh & T. Burrage (1987).** Host-parasite relationship of *Leishmania-mexicana-mexicana* and *Lutzomyia-abonnenci* (Diptera, Psychodidae). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 36, 294-314.
- Zakai, H. A., M. L. Chance & P. A. Bates (1998).** In vitro stimulation of metacyclogenesis in *Leishmania braziliensis*, *L-donovani*, *L-major* and *L-mexicana*. *Parasitology*, 116, 305-309.